

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
26. April 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/29238 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/82,  
9/10, C12P 21/00, A01H 5/00, C12P 7/64

(74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald Patentanwalts  
GmbH, Eisenhof, Eisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10363

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
20. Oktober 2000 (20.10.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 50 589.6 20. Oktober 1999 (20.10.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): GESELLSCHAFT FÜR ERWERB UND  
VERWERTUNG VON SCHUTZRECHTEN - GVS  
MBH [DE/DE]; Kaufmannstrasse 71-73, 53115 Bonn  
(DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WOLTER, Frank,  
P. [DE/DE]; Moselweg 9, 53347 Alfken-Oedekoven  
(DE). HAN, Jixiang [CN/GB]; No. 13, 902 Arrowhead  
Drive, Oxford, OH 45056 (GB). FRENTZEN, Margrit  
[DE/DE]; Nizzaallee 46a, 52072 Aachen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ELONGASE PROMOTERS FOR THE TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF TRANSGENES IN PLANTS

(54) Bezeichnung: ELONGASEPROMOTOREN FÜR GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON TRANSGENEN IN  
PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to chimerical genes that have (i) a DNA sequence coding for a desired product, and (ii) an  
elongase promoter. The DNA sequence is functionally linked with the promoter to allow expression of the product under the control  
of the promoter. The invention further relates to vectors, plant cells, plants and plant parts and microorganisms that contain the  
chimerical gene and to methods for producing such vectors, plant cells, plants and plant parts and microorganisms. The invention also  
relates to elongase-encoding sequences from *Brassica napus* and to transgenic plants and microorganisms expressing said sequences.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft chimäre Gene mit (i) einer DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes Pro-  
dukt kodiert, und (ii) einem Elongasepromotor, worin die DNA-Sequenz mit dem Promotor operativ verknüpft ist, um Expression  
des Produkts unter Kontrolle des Promotors zu erlauben. Die Erfindung betrifft weiter Vektoren, Pflanzenzellen, Pflanzen und Pflanz-  
enteile sowie Mikroorganismen, die das chimäre Gen enthalten sowie Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen, Pflanzen  
und Pflanzenteile und Mikroorganismen. Weiter betrifft die Erfindung für Elongase kodierende Sequenzen aus *Brassica napus* und  
transgene Pflanzen sowie Mikroorganismen, die diese Sequenzen exprimieren.

WO 01/29238 A2

**Elongasepromotoren für gewebespezifische Expression  
von Transgenen in Pflanzen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft chimäre Gene mit (i) einer DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes Produkt kodiert, und (ii) einem Elongasepromotor, worin die DNA-Sequenz mit dem Promotor operativ verknüpft ist, um Expression des Produkts unter Kontrolle des Promotors zu erlauben. Die Erfindung betrifft weiter Vektoren, Pflanzenzellen, Pflanzen und Pflanzenteile, die das chimäre Gen enthalten sowie Verfahren zur Herstellung solcher
- 10 Pflanzenzellen, Pflanzen und Pflanzenteile. Die Erfindung betrifft auch für aktive Elongase-Enzyme kodierende Sequenzen aus *Brassica napus* und transgene Mikroorganismen und Pflanzen, die für Elongase kodierende Sequenzen enthalten. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu länger-kettigen Fettsäuren in transgenen Pflanzen und zur Herstellung von länger-kettigen, mehrfach ungesättigten
- 15 Fettsäuren in Mikroorganismen und Pflanzen.

- Langkettige Fettsäuren, die über 18 Kohlenstoffatome umfassen und auch als very-long-chain fatty acids (VLCFAs) bezeichnet werden, sind in der Natur weit verbreitet. Diese Fettsäuren kommen in erster Linie in Samenölen verschiedener Pflanzenspezies vor, wo sie meist
- 20 eingebaut in Triacylglyceride vorliegen. In dieser Form findet man VLCFAs insbesondere in Brassicaceae, Tropaeolaceae und Limnanthaceae. Die Samenöle der Brassicaceae-Familie, wie *Brassica napus*, *Crambe abyssinica*, *Sinapsis alba*, *Lunaria annua*, enthalten üblicherweise 40-60% Erucasäure (cis-13-Docosensäure, 22:1<sup>Δ13</sup>), während in der Tropaeolaceae-Familie auch bis zu 80% Erucasäure im Samenöl vorkommen können. Die Samenöle der
- 25 *Limnanthes*-Spezies oder Jojoba enthalten sogar mehr als 90% VLCFAs.

- In Samenölen akkumulieren VLCFAs gewöhnlicherweise als cis n-9 einfach ungesättigte Fettsäuren wie 20:1<sup>Δ11</sup>, 22:1<sup>Δ13</sup> und 24:1<sup>Δ15</sup>, wobei in einigen Spezies auch VLCFAs vom cis n-7-Typ vorkommen, wie z.B. 20:1<sup>Δ13</sup> in *Sinapsis alba*, und beispielsweise im Öl von
- 30 *Limnanthes*-Spezies 20:1<sup>Δ5</sup> vorherrscht.

- 2 -

- Die Anwendungsgebiete pflanzlicher Fette und Öle reichen von Wasch- und Reinigungsmitteln über Kosmetikartikel bis zu Farbzusätzen, Schmierstoffen und Hydraulikölen. Insbesondere ein hoher Gehalt als Erucasäure gilt in der klassischen wie der modernen Pflanzenzüchtung als Zuchtziel, da sie nicht nur als Antischaummittel in Waschmitteln oder als Antiblockiermittel bei der Kunststoffherstellung zum Einsatz kommt, sondern Erucasäure und ihre Derivate, wie Arachinsäure, Pelagonsäure, Brassylsäure und Erucasäureamide, auch als Konservierungsmittel, Aromastoff, Kunststoffweichmacher, Formulierungsmittel, Flotationsmittel, Netzmittel, Emulgator und Gleitmittel Anwendung finden.
- 10 VLCFAs werden durch sukzessive Übertragung von C<sub>2</sub>-Einheiten von Malonyl-CoA auf langkettige Acylgruppen, die aus der *de novo*-Fettsäuresynthese in the Plastiden stammen. Diese Elongationsreaktionen werden durch Fettsäure-Elongasen (FAE) katalysiert, wobei jeder Elongationszyklus aus vier enzymatischen Schritten besteht: (1) Kondensation von Malonyl-CoA mit einem langkettigen Acylrest, wodurch  $\beta$ -Ketoacyl-CoA entsteht, (2)
- 15 Reduktion des  $\beta$ -Ketoacyl-CoAs zu  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA, (3) Dehydrierung von  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA to trans-2,3-Enoyl-CoA, (4) Reduktion von trans-2,3-Enoyl-CoA, was in einem verlängerten Acyl-CoA resultiert. Die Kondensationsreaktion, die durch eine  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) katalysiert wird, ist der Geschwindigkeits-limitierende Schritt der Kettenverlängerung.
- 20 VLCFAs reichern sich vorrangig in Triacylglyceriden von Samen der meisten *Brassica*-Spezies wie *Brassica napus* an. In sich entwickelnden Ölsamen werden Triacylglyceride über den Kennedy-Pathway synthetisiert, an dem in erster Linie die folgenden vier enzymatische Reaktionen beteiligt sind. Zuerst wird Glycerol-3-Phosphat durch Acyl-CoA an der sn-1-
- 25 Position acyliert, um Lysophosphatidat (sn-1-Acylglycerol-3-Phosphat) zu bilden. Diese Reaktion wird durch eine sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) katalysiert. Dann erfolgt ein zweiter Acylierungsschritt, katalysiert durch eine sn-1-Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT), wodurch Phosphatidat

entsteht, das im nächsten Schritt durch Hydrolyse, katalysiert durch eine Phosphatidat-Phosphatase, zu Diacylglycerol (DAG) umgewandelt wird. Schließlich wird DAG an seiner sn-3-Position durch eine sn-1,2-Diacylglycerol-Acyltransferase (DAGAT) zu einem Triacylglycerid acyliert.

5

Während der letzten Jahre konnten KCS-Gene aus *A. thaliana* und Jojoba kloniert werden. Durch Transposon-Tagging mit dem Mais-Transposonaktivator gelang die Klonierung des Fettsäureelongationsgens 1 (FAE1), dessen Produkt an der VLCFA-Synthese beteiligt ist (James *et al.* (1995) Plant Cell 7:309-319). Weiterhin konnte ein cDNA-Klon aus Jojoba von Lassner *et al.* aus einer cDNA-Bank aus sich entwickelnden Samen isoliert werden. (1996, 10 Plant Cell 8:281-292). Kürzlich gelang die Klonierung des *A. thaliana* KCS1-Gen (Todd *et al.* (1999) Plant J. 17:119-130). Die Isolierung einer cDNA, die für eine 3-Ketoacyl-CoA-Synthase aus *Brassica napus* kodiert, wurde 1997 von Clemens und Kunst beschrieben (Plant Physiol. 115, 313-314); allerdings scheint die in diesem Stand der Technik offenbarte cDNA- 15 Sequenz nicht für ein aktives Enzym zu kodieren.

Obwohl es sich bei Raps um die wichtigste Produktionsstätte pflanzlicher Öle handelt und die moderne Pflanzenzüchtung aus diesem und weiteren Gründen ein besonders großes Interesse an nützlichen Genen aus eben dieser Kulturpflanze hat, konnte ein  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase- 20 Gen aus Raps, das für ein aktives Enzym kodiert bzw. dessen Übertragung auf transgene Organismen auch tatsächlich in einer nachweisbaren KCS-Aktivität resultiert, bisher nicht erfolgreich isoliert werden.

Rapsöl enthält natürlicherweise hohe Konzentrationen an Erucasäure (~ 50%) und Rapsorten 25 mit hohem Erucasäuregehalt (high erucic acid rapeseed, HEAR) sind die Hauptquelle für Erucasäure als industrieller Futterbestand. Jedoch ist der gegenwärtige Gehalt von 55% Erucasäure in den Samenölen von HEAR-Sorten nicht ausreichend, um angesichts der hohen Kosten der Aufreinigung der Erucasäure mit den Alternativquellen aus Petrochemikalien

- 4 -

konkurrieren zu können. Die Erhöhung des Erucasäuregehalts im Rapsöl mittels gentechnologischer Verfahren könnte hier Abhilfe schaffen und die industrielle Nützlichkeit von Raps als Erucasäureproduzent deutlich verbessern. Andererseits ist Erucasäure aufgrund ihrer unangenehmen geschmacklichen und anderer negativen Eigenschaften als Bestandteil von Lebensmitteln unerwünscht, was während der letzten Jahre zur Züchtung von Rapsorten mit niedrigem Erucasäuregehalt (low erucic acid rapeseed, LEAR) führte, die fast frei von Erucasäure im Samenöl sind. Rapsorten lassen sich somit in für die Industrie interessante HEAR-Sorten einerseits und ernährungstechnisch vorteilhafte LEAR-Sorten andererseits unterteilen.

10 Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens bzw. eines darauf basierenden Verfahrens, mit dem der Gehalt an 22:1-Fettsäuren in Pflanzen und insbesondere in Ölsaaten besonders vorteilhaft gesteigert werden kann.

15 Diese Aufgabe wird durch die erfolgreiche Isolierung und Charakterisierung eines KCS-Gens aus *Brassica napus* gelöst.

Es wurde jetzt überraschend gefunden, daß sich KCS-Gene und insbesondere das in den Ausführungsbeispielen beschriebene KCS-Gen aus Raps gut für die Erhöhung des Gehalts an VLCFA und insbesondere an 22:1-Fettsäuren in transgenen Organismen, insbesondere in Ölsaaten, eignen. Dabei ist nicht nur der besonders hohe Gehalt an Erucasäure, der durch Expression des erfindungsgemäßen KCS-Gens erreicht werden kann, vorteilhaft gegenüber dem Stand der Technik, sondern auch die beobachtete Erhöhung des Verhältnisses von 22:1-Fettsäuren zu den weniger erwünschten 20:1-Fettsäuren.

Langkettige Fettsäuren besitzen auch im Nahrungsmittel- und Pharmabereich große Bedeutung. Hier sind es allerdings in erster Linie die mehrfach ungesättigten langkettigen

- 5 -

- Fettsäuren (engl.: long chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA), deren essentielle Bedeutung für die menschliche Gesundheit in letzter Zeit immer deutlicher wurde. Es handelt sich um Fettsäuren mit zwei, vor allem aber drei und mehr Doppelbindungen und Kettenlängen von 18 und mehr Kohlenstoffatomen, vor allem aber solchen Kettenlängen von
- 5 22 und 24. Wichtige Vertreter sind die Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure), die Eicosapentaensäure (5,8,11,14,17-Icosapentaensäure, EPA) und die Docosapentaensäure (Clupanodonsäure, 4,8,12,15,19-Docosapentaensäure, DHA). Als natürliche Quelle für LC-PUFA steht vor allem Fisch zur Verfügung. Bei dem neuerdings erkannten hohen Bedarf und der jetzt schon bedrohlichen Überfischung der Meere ist der Weltbedarf aus dieser Quelle auf
- 10 Dauer nicht zu decken. Biotechnologische Methoden zur Herstellung rücken daher in den Vordergrund. Für diese Produktion kommen dabei vor allem Mikroorganismen und Pflanzen in Betracht. Bei den Mikroorganismen bieten sich vor allem Hefen, Pilze und Bakterien an.

- Die Biosynthese dieser Fettsäuren verläuft ausgehend von den weit verbreiteten Fettsäuren
- 15 Linolsäure und alpha-Linolensäure über wechselweise erfolgende Desaturierungs- und Elongationsschritte. Vor allem die hierfür notwendigen Desaturasen sind Objekt intensiver Forschung, deren Gene vor allem aus marinen Mikroorganismen isoliert wurden und dem Fachmann bekannt sind. Ein noch nicht befriedigend gelöstes Problem stellen die notwendigen Elongationsschritte dar, da die in den Zielorganismen befindlichen Elongase-
- 20 Systeme diese Fettsäuren entweder gar nicht oder nur unzureichend elongieren.

- Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher in der Bereitstellung eines  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens und eines entsprechenden Verfahrens, mit dem PUFA sowohl in Mikroorganismen als auch in Pflanzen zu den gewünschten sehr langkettigen LC-PUFA-
- 25 Spezies von 20 und mehr Kohlenstoffatomen elongiert werden können. Bei den LC-PUFA handelt es sich insbesondere um 18:2<sup>9,12</sup>, 18:3<sup>9,12,15</sup>, 18:3<sup>6,9,12</sup>, 20:3<sup>8,11,14</sup> und 20:4<sup>5,8,11,14</sup>.

- 6 -

Das Problem der Elongation von PUFA und vor allem sehr langkettigen PUFA mittels molekularbiologischer Techniken und geeigneter Gene ist im Stand der Technik bis dato nicht in befriedigender Weise gelöst worden.

- 5 Diese Aufgabe wird jetzt gelöst durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Elongation kürzerkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren in transgenen Mikroorganismen und Pflanzen durch Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wobei die Elongation durch eine  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase in den transgenen Mikroorganismen oder Pflanzen katalysiert wird. Bevorzugt  
10 handelt es sich bei der KCS um ein Enzym, das natürlicherweise in Raps vorkommt.

- Dabei können nicht nur natürlicherweise vorkommende mehrfach ungesättigte Fettsäuren elongiert werden, sondern auch solche mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die der Mikroorganismus oder die Pflanze aus seiner bzw. ihrer Umgebung aufnimmt. Weiter können  
15 auch solche mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch die enzymatische Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase elongiert werden, die durch gentechnische Veränderungen des Zielorganismus, also des Mikroorganismus oder der Pflanze, in dem Zielorganismus erzeugt werden. Hierbei bietet sich insbesondere die Co-Expression von Desaturase-Genen in dem Zielorganismus an, die die Bereitstellung der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren  
20 als Substrat für die  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase gewährleisten. Selbstverständlich können Desaturase-Gene in dem Zielorganismus auch mit weiteren Elongase-Genen co-exprimiert werden, um die gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, also mit gewünschter Kettenlänge, im Zielorganismus bereitzustellen.
- 25 Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA) durch Elongation kürzerkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, Hefen und Pilzen, sowie in Pflanzenzellen durch (i) Elongation von natürlicherweise vorkommenden mehrfach

- 7 -

ungesättigten Fettsäuren oder (ii) Elongation von aus der Umgebung aufgenommenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, umfassend die Schritte:

- 5 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus oder der Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- 10 c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.

- Im Fall von transgenen Pflanzenzellen müssen nicht in jedem Fall vollständige transgene Pflanzen regeneriert werden. Je nach Bedarf kann es wünschenswert sein, die Produktion der langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA) in Pflanzenzellen, z.B. in Form von Suspensionskulturen oder Kalluskulturen durchzuführen.
- 15

- Die Beobachtung, daß die erfindungsgemäß verwendeten KCS-Gene, und hier insbesondere das KCS-Gen aus Raps, in transgenen Organismen und Zellen ein Genprodukt erzeugen, das in der Lage ist, PUFA und insbesondere LC-PUFA zu elongieren, ist äußerst überraschend. Bisher war lediglich bekannt, daß KCS eine Rolle bei der Elongation von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren spielen.
- 20

- Bei der Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert, handelt es sich bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz aus *Brassica napus*. Besonders bevorzugt handelt es sich um eine Nukleinsäuresequenz, umfassend die in SEQ ID No. 1 angegebene Sequenz, oder Teile davon. Weitere KCS-Gene kann der Fachmann der
- 25



Literatur und den Gendatenbanken entnehmen. Dabei ist der von Clemens und Kunst 1997 in Plant Physiol. (Vol. 115, Seiten 113-114) unter Hinweis auf die Accession No. AF009563 offenbarte cDNA-Klon ausdrücklich ausgenommen, da die hier beschriebene cDNA-Sequenz nicht für ein Protein mit der Aktivität einer KCS kodiert. Der Nachweis einer KCS-  
5 enzymatischen Aktivität wurde von den Autoren aus nicht erbracht; der Stand der Technik beschränkt sich vielmehr auf die Offenbarung der in Accession No. AF009563 zugänglichen Sequenz.

- 10 In einer besonderen Ausführungsform werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens solche mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere LC-PUFA, elongiert, die durch gentechnische Manipulationen im Zielorganismus erzeugt werden, wobei die gentechnischen Manipulationen die Expression von Desaturase-Genen sowie die Expression weiterer Elongase-Gene umfassen kann.
- 15 Für die Produktion sehr langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie Arachidonsäure oder Eicosapentaensäure sind  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene erforderlich. Geeignete Gene wurden aus verschiedenen Organismen kloniert und stehen dem Fachmann zur Verfügung, siehe z.B. Sperling et al. (2000), Eur. J. Biochem. 267, 3801-3811; Cho et al. (1999), J. Biol. Chem. 274, 471-477; Sakoradani et al. (1999), Gene 238, 445-453; Sayanova et al. (1999),  
20 Journal of Experimental Botany 50, 1647-1652; Girke et al. (1998), The Plant Journal 15, 39-48; Huang et al. (1999), Lipids 34, 649-659; Saito et al. (2000), Eur. J. Biochem. 267, 1813-1818; Cho et al. (1999), J. Biol. Chem. 274, 37335-37339; Knutzon et al. (1998), J. Biol. Chem. 273, 29360-29366; Michaelson et al. (1998), J. Biol. Chem. 273, 19055-19059; Broun et al. (1999), Annu. Rev. Nutr. 19, 197-216; Napier et al. (1998), Biochem. J. 230, 611-614;  
25 Nunberg et al. (1996), Plant Physiol. 111 (Supplement.), 132; Reddy et al. (1996), Nat. Biotechnol. 14, 639-642; Sayanova et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4211-4216.

- 9 -

Je nach erwünschter langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäure müssen neben geeigneten Desaturase-Genen auch weitere Gene, wie Elongase-Gene übertragen werden. So sollte z.B. bei der Produktion von Docosapentaensäure (22:6) neben einer  $\Delta 6$ -Desaturase, die die  $\Delta 6$ -Desaturierung zu 24:6 gewährleistet, auch eine Elongase exprimiert werden, die die

5 Elongation von 22:5 in 24:5 katalysiert.

Geeignete Desaturase- und Elongase-Gene kann der Fachmann der Literatur sowie den Gendatenbanken problemlos entnehmen. Für  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthasen, die  $\gamma$ -Linolensäure (GLA) elongieren können, wurden bereits aus *C. elegans* und *Mortierella alpina* geeignete

10 Gene kloniert (siehe z.B. Das et al. (2000), 14th International Symposium on Plant Lipids, Cardiff, 23/28 July 2000 ("Polyunsaturated fatty acids specific elongation enzymes"), Beaudoin et al. (2000), 14th International Symposium on Plant Lipids, Cardiff, 23/28 July 2000 ("Production of C20 polyunsaturated fatty acids by pathway engineering: Identification of a PUFA elongase component"); Beaudoin et al. (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,

15 5421-5426.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung von längerkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA) durch Elongation kürzerkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, Hefen und Pilzen, sowie in

20 Pflanzenzellen durch Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in dem Mikroorganismus bzw. der Pflanzenzelle aufgrund der Expression eines oder mehrerer eingeführten Desaturase- oder/und Elongase-Gene erzeugt werden, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus oder der
- 25 Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,

- 10 -

- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Änderung der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Aktivität in transgenen Pflanzen durch Übertragung und Expression einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase aus *Brassica napus* kodiert. Vorzugsweise umfasst die Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, die in SEQ ID No. 1 angegebenen Sequenz oder Teile davon.

Neben Bakterien, Pilzen und Hefen können auch Algen für die Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Weiter besteht eine Aufgabe der Erfindung in der Bereitstellung eines neuen samenspezifischen Promotors für die Herstellung transgener Pflanzen mit veränderter Genexpression.

Diese Aufgabe wird durch die Isolierung und Charakterisierung eines KCS-Promotors gelöst, der sich für die samenspezifische Expression beliebiger kodierender Regionen in Pflanzen eignet. Wie weiter unten gezeigt werden wird, handelt es sich bei dem KCS-Promotor um einen besonders starken Promotor, der für die gewebespezifische Expression interessanter Gene in Pflanzen besonders nützlich ist. Dabei kann der KCS-Promotor als Translations- oder Transkriptionsfusion mit gewünschten kodierenden Regionen vorliegen und auf Pflanzen-

- zellen übertragen werden. Sowohl die Herstellung geeigneter chimärer Genkonstrukte wie auch die Transformation von Pflanzen mit diesen Konstrukten kann der Fachmann mittels Standardmethoden durchführen. Siehe bspw. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, bzw. Willmitzer L. (1993) *Transgenic Plants*, in: *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler, P.Stadler, eds., Vol.2, 627-659, V.C.H. Weinheim - New York - Basel - Cambridge. Zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzen bieten sich verschiedene Methoden an. Zum einen können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe herkömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart verändert werden, daß die neuen Nukleinsäuremoleküle in das pflanzliche Genom integriert werden, d.h. daß stabile Transformanten erzeugt werden. Zum anderen kann ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, dessen Anwesenheit und gegebenenfalls Expression in der Pflanzenzelle einen veränderten Fettsäuregehalt bewirkt, in der Pflanzenzelle bzw. der Pflanze als selbstreplizierendes System enthalten sein. Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, deren Replikationssignale für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann in einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysenmethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation

- pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Bei
- 5 der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate, verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig. Dem Fachmann sind die Genselektions-
- 10 marker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen. Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als
- 15 Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien
- 20 integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und ein Linker oder Polylinker, welche
- 25 von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig

transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben worden. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können

5 Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biocide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert

10 werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind ebenfalls bekannt und vielfach beschrieben. Ist die

15 eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biocid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin und u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher

20 die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise. Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die

25 daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden. Es sollten zwei oder mehrere Generationen herangezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um

- 14 -

sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind. Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für die neuen Nukleinsäuremoleküle homozygot sind, und ihr phänotypisches Verhalten hinsichtlich eines veränderten Fettsäuregehalts untersucht und mit dem von hemizygoten Linien  
5 verglichen werden.

Für die Übertragung eines Resistenzmarkers bietet sich auch eine Co-Transformation an, bei der der Resistenzmarker separat übertragen wird. Die Co-Transfektion ermöglicht auf einfache Weise die anschließende Entfernung des Resistenzmarkers durch Auskreuzen.

10

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder Promotorregion hybridisieren. Der Begriff „Hybridisierung“ bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie bspw. in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Promotorregionen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und alleliche Varianten der Nukleinsäuresequenzen und Promotorregionen. Der Ausdruck „Derivat“ bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den erfindungsgemäßen Sequenzen an einer oder mehreren

15

20

Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 50%, bevorzugt von mindestens 70-80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen können durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

25

Bedingungen, die eine selektive Hybridisierung gewährleisten, kann der Fachmann üblichen Laborhandbüchern entnehmen, beispielsweise Sambrook et al., supra.

- 15 -

Für die samenspezifische Expression der erfindungsgemäßen KCS-Sequenzen in transgenen Pflanzen eignet sich jedes samenspezifische Regulationselement, insbesondere Promotoren. Als Beispiele erwähnt seien hier der USP-Promotor (Bäumlein et al. 1991, Mol. Gen. Genet. 225:459-467), der Hordein-Promotor (Brandt et al. 1985, Carlsberg Res. Commun. 50:333-345), sowie der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, die dem auf dem Gebiet der pflanzlichen Molekularbiologie tätigen Fachmann wohl bekannt sind.

Gegebenenfalls können die Nukleinsäuresequenzen oder Promotorregionen der Erfindung durch Enhancer-Sequenzen oder andere regulatorische Sequenzen ergänzt sein. Die regulatorischen Sequenzen beinhalten z.B. auch Signalsequenzen, die für den Transport des Genprodukts zu einem bestimmten Kompartiment sorgen.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich bevorzugt um Ölsaaten, insbesondere um Raps, Rüpsen, Sonnenblume, Sojabohne, Erdnuß, Kokospalme, Ölpalme, Baumwolle, Lein.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Bereitstellung samenspezifischer Expression einer kodierenden Region in Pflanzensamen, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine Promotorregion, die natürlicherweise upstream einer für ein Protein mit der Aktivität einer KCS kodierenden Sequenz vorliegt, in operativer Verknüpfung mit einer heterologen kodierenden Region vorliegt,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

Als kodierende Region, die unter Kontrolle eines erfindungsgemäßen KCS-Promotors in transgenen Pflanzen exprimiert wird, eignet sich jede für ein nützliches Protein kodierende



- Region, wobei das Protein insbesondere lebensmitteltechnisch, pharmazeutisch oder kosmetisch, landwirtschaftlich oder für die chemische Industrie nützlich sein kann. Beispiele sind Proteine, die eine Rolle in der Fettsäurebiosynthese und im Lipidstoffwechsel spielen, wie Desaturasen und Elongasen, Acyltransferasen, Acyl-CoA-Synthetasen, Acetyl-CoA-Carboxylasen, Thioesterasen. Zu erwähnen sind auch Glykosyltransferasen, Zuckertrans-  
5 Carboxylasen, Thioesterasen. Zu erwähnen sind auch Glykosyltransferasen, Zuckertrans-ferasen und Enzyme, die am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind. Prinzipiell aber kann jedes interessante Protein unter Verwendung der erfindungsgemäßen KCS-Promotoren samenspezifisch exprimiert werden, so daß Samen auch allgemein als Bioreaktor für die Expression hochwertiger Proteine genutzt werden können. Die erfindungsgemäßen KCS-  
10 Promotoren eignen sich auch allgemein dazu, die Strukturbeschaffenheit und Farbe von Pflanzensamen zu beeinflussen.

- Die erfindungsgemäßen Promotorregionen können aber auch vorteilhaft zur gewebe-spezifischen Ausschaltung unerwünschter Genaktivitäten eingesetzt werden, wobei sich hier  
15 Antisense- und Cosuppressionstechniken anbieten.

- Die Erfindung betrifft dabei nicht nur chimäre Gene, sondern auch die natürlicherweise vorkommende Kombination des KCS-Promotors mit der für die KCS kodierenden Region.
- 20 Bei dem KCS-Promotor handelt es sich bevorzugt um eine Promotorregion, die natürlicherweise die Expression eines KCS-Gens in Brassicaceen, besonders bevorzugt in *Brassica napus*, kontrolliert. Am meisten bevorzugt handelt es sich bei der Promotorregion um eine Sequenz, die von der in SEQ ID No. 2 dargestellten Sequenz umfasst ist, wobei die Promotorregion mindestens die beiden Promotorelemente TATA-Box und CAAT-Box  
25 umfasst (siehe auch Hervorhebung in Abbildung 6).

Weiter ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu länger-kettigen Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer für eine KCS aus Raps kodierenden Nukleinsäuresequenz, insbesondere mit einer kodierenden Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder mit einer für ein Protein gemäß SEQ ID No. 1 bzw. 3 kodierenden Sequenz, vorliegt,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
- 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

Außerdem ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Erhöhung des Verhältnisses von 22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer für eine KCS aus Raps kodierenden Nukleinsäuresequenz, insbesondere mit einer kodierenden Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer für ein Protein gemäß SEQ ID No. 1 bzw. 3 kodierenden
  - 20 Sequenz, vorliegt,
  - b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
  - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
- 25 Die vorgenannten Verfahren sind nicht auf die Anwendung in transgenen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen beschränkt, sondern eignen sich auch für die Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu länger-kettigen Fettsäuren bzw. für die Erhöhung des Verhältnisses von

22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren in transgenen Mikroorganismen, wie Pilzen, Hefen und Bakterien, sowie Algen.

- Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, zur Herstellung transgener Mikroorganismen oder Pflanzenzellen mit einem gegenüber den Ausgangsformen zu länger-kettigen Fettsäuren verschobenen Muster an mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

- Der Begriff „Ausgangsform“ wird hier verwendet, um sowohl den Wildtyp-Mikroorganismus bzw. die Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. -pflanze als auch solche Mikroorganismen bzw. Pflanzenzellen einzuschließen, in die zusätzlich zu der für eine KCS kodierenden Nukleinsäuresequenz auch Sequenzen für Desaturase- und/oder weitere Elongase-Gene eingeführt wurden.

- Vorzugsweise handelt es sich bei der Nukleinsäuresequenz auch hier um eine Nukleinsäuresequenz, die für eine KCS aus Raps kodiert, besonders bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz, die von der in SEQ ID Nr. 1 angegebenen DNA-Sequenz umfasst ist.

- Es versteht sich, daß bei Verwendung der Formulierung „Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID 1“ auch solche Nukleinsäuresequenzen umfasst sind, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus

- a) DNA-Sequenzen, die eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die die in SEQ ID No. 1 oder 3 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren,
- b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID No. 1 angegebene Nukleinsäuresequenz oder Teile davon enthalten,
- c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) oder b) hybridisieren, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfassen,

- 19 -

- d) DNA-Sequenzen, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz von a), b) oder c) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfassen,
- 5 e) DNA-Sequenzen, die ein-Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleinsäuresequenz von a), b), c) oder d) darstellen.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

10

#### Beispiele

Beispiel 1: Isolierung eines vollständigen KCS-cDNA-Klons aus *Brassica napus*

- 15 Ein ca. 1,0 kb langes Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer

1: 5'-ATG ACG TCC GTT AAC GTT AAG-3' (sense)

und

2: 5'-ATC AGC TCC AGT ATG CGT TC-3' (antisense)

- 20 aus der kodierenden Region des Arabidopsis-Fettsäureelongationsgens 1 (FAE1, James *et al.*, *supra*) amplifiziert. Dieses Fragment wurde als heterologe Sonde für das Screenen einer Raps  $\lambda$ -ZAP cDNA-Library aus unreifen Schoten von *B. napus* cv. Askari (Fulda *et al.* (1997) Plant Mol. Biol. 33:911-922) verwendet. Askari ist eine HEAR-Linie, die in ihrem Samenöl 55% Erucasäure enthält. 5 positive cDNA-Klone konnten aus ca.  $1 \times 10^6$  Plaques isoliert werden.
- 25 Restriktionsanalyse ergab, daß alle 5 Klone ein Insert von etwa 1,7 kb Länge enthielten. Sequenzanalyse zeigte, daß die überlappenden Regionen von sowohl dem 5'- als auch dem 3'-Ende der cDNAs identisch waren (etwa 800 bp), daß aber in allen cDNAs 8-14 Nukleotide am 5'-Ende, vermutlich einschließlich des Startcodons, fehlten. Um einen vollständigen

- 20 -

cDNA-Klon zu erhalten, wurde eine homologe Sonde von dem längsten cDNA-Klon amplifiziert, unter Verwendung der Oligonukleotidprimer

H1: 5'-CGT TAA CGT AAA GCT CCT TTA C-3' (sense)

5 und

H2: 5'-TAG ACC TGA ACG TTC TTG AAT C-3' (antisense),

und für weitere Screeningexperimente mit der cDNA-Library eingesetzt. Da nach zwei weiteren Screeningrunden immer noch kein vollständiger cDNA-Klon gefunden war, wurde  
10 eine „nested PCR“ mit aus der cDNA-Bank extrahierter Template-DNA eingesetzt, um das 5'-Ende des Inserts zu amplifizieren. Wie die Sequenzanalyse der amplifizierten Fragmente ergab, konnte auch auf diese Weise kein full-length-Klon in der Library detektiert werden. Es wurde daher eine inverse PCR (Ochman et al. (1988) Genetics 120:621-623) für die Klonierung des fehlenden 5'-Endes mit genomischer DNA aus der Askari-Rapslinie als  
15 Template eingesetzt. Zwei spezifische Primer

IP1: 5'-TGA CGT AAT GGT AAA GGA GC-3' (antisense)

und

IP3: 5'-TTC AAG CTC CGA AGC AAC-3' (sense)

20

wurden entsprechend dem 5'-Ende der klonierten cDNA, aber in entgegengesetzten Orientierungen konstruiert. Für den Verdau der genomischen DNA wurde das Restriktionsenzym HindIII verwendet, da zwar eine HindIII-Schnittstelle downstream des Primers IP3, aber keine HindIII-Site in der Region zwischen den Primern lag. Nach Verdau und Ligation  
25 der genomischen DNA, wurde die Orientierung der Primer umgedreht, so daß die PCR ablaufen konnte. Ein 1,5 kb-Fragment konnte mittels DNA-Polymerasen mit proof reading-Kontrolle, wie z.B. pfu von Stratagene, amplifiziert werden. Das PCR-Fragment wurde kloniert und sequenziert. Die DNA-Sequenzen von drei unabhängigen Klonen waren

identisch und enthielten das fehlende 5'-Ende (AGCAATGACGTC, das vermutliche Startcodon ist unterstrichen) der cDNA.

- Die vollständige Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz der KCS-cDNA aus *B. napus* cv. Askari ist in Abbildung 1 gezeigt (SEQ ID Nr. 1). Die für die inverse PCR verwendeten Primer sind in Abbildung 1 unterstrichen. Ebenfalls unterstrichen sind die anderen Primer, die für die Amplifikation genomischer DNA aus *B. napus* cv. Drakkar und Linie RS306 eingesetzt wurden (siehe Beispiel 2). Forward und reverse Primer sind durch horizontale Pfeile markiert. Das vermutliche Startcodon und Stopcodon sowie die Polyadenylierungssequenz sind umrandet. Das polyA-Signal des Klons #b3 ist durch einen vertikalen Pfeil eingezeichnet. Die vermutliche active site Cys223 ist durch ein gefülltes Dreieck markiert.

- Der open reading frame (ORF) hat eine Länge von 1521 bp und kodiert für ein Polypeptid von 506 Aminosäuren (plus Stopcodon), das ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 56,4 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 9,18 hat.

- Für die Analyse des Expressionsmusters des KCS-Gens in *B. napus* wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus Blättern und unreifen Embryos von verschiedenen Entwicklungsstadien von Askari-Rapspflanzen nach Standardmethoden isoliert und mit einer *B. napus* KCS-cDNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Wie erwartet, konnte ein 1,7 kb langes Transkript nur in sich entwickelnden Embryos, aber nicht in Blättern detektiert werden. Dieses Transkript war eindeutig nachweisbar in Embryos 16 Tage nach der Bestäubung, dann nahm seine Konzentration allmählich zu und erreichte ihr Maximum ungefähr 30 Tage nach der Bestäubung, um dann bis zum 40. Tag nach der Bestäubung wieder leicht abzufallen. Diese Northern Blot-Daten zeigten eindeutig, daß die Expression des KCS-Gens sowohl zeitlich als auch räumlich in Wildtyppflanzen von Raps reguliert ist.

Beispiel 2: Isolierung von genomischen KCS-Klonen aus *B. napus*

- 5 Für die Isolierung genomischer KCS-Klone aus der *B. napus*-Linie RS306, einer HEAR-Linie, und aus *B. napus* cv. Drakkar, einer LEAR-Sorte (22:1 < 1%), wurden die Primer

GP1: 5'-AGG ATC CAT ACA AAT ACA TCT C-3' (sense)

und

- 10 GP2: 5'-AGA GAA ACA TCG TAG CCA TCA-3' (antisense),

abgeleitet von den 5'- und 3'-UTRs der in Abbildung 1 gezeigten cDNA, eingesetzt. Beide genomischen KCS-Sequenzen, aus RS306 und aus Drakkar, enthielten einen ORF von 1521 bp (identisch zu dem ORF der cDNA, siehe Beispiel 1), was bedeutet, daß das KCS-Gen von

- 15 Raps keine Introns aufweist. Die abgeleiteten Proteine enthalten 506 Aminosäurereste, mit einem Molekulargewicht von 56,46 kDa und einem pI von 9,18 bzw. einem Molekulargewicht von 56,44 kDa und einem pI von 9,23. Verglichen mit der cDNA in Abbildung 1 zeigte die abgeleitete Aminosäuresequenz des genomischen KCS-Klons aus RS306 vier Aminosäureaustausche in den Positionen 286 (Gly286Arg), 323 (Ile323Thr), 395  
20 (Arg395Lys) und 406 (Ala406Gly), während die genomische Sequenz aus Drakkar nur einen Austausch gegenüber der cDNA aus Askari enthielt, nämlich in Position 282 (Ser282Phe).

Diese Unterschiede in den Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 2 zusätzlich veranschaulicht. BnKCSa = KCS-cDNA aus *B. napus* cv. Askari, BnKCSd = genomischer KCS-

- 25 Klon aus *B. napus* cv. Drakkar, und BnKCSr = genomischer KCS-Klon aus *B. napus* RS306.

Es wird gegenwärtig angenommen, daß die Mutation in Position 282 (Ser282Phe) in einem katalytisch inaktiven KCS-Protein resultiert und dadurch den LEAR-Phenotyp verursacht.

Verschiedene Hinweise stützen die Hypothese, daß der Rest Ser282 von essentieller Bedeutung für die KCS-Aktivität des Wildtyp-Proteins ist, wobei die Rolle des Serin-Restes eher struktureller als katalytischer Art zu sein scheint.

- 5 Schließlich sei darauf hingewiesen, dass sich die in SEQ ID No. 1 dargestellte Sequenz in Aminosäure 307 von der von Clemens und Knust (1997, vide supra) veröffentlichten Sequenz unterscheidet.

10 Beispiel 3: Expression von KCS aus *B. napus* in transgenen *B. napus*-Pflanzen

Für die Expression der KCS aus *B. napus* cv. Askari in transgenen Pflanzen wurden zunächst verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt, die in Abbildung 3 veranschaulicht sind. Dabei wurde für die Konstruktion von KCS-Gen-Fusionen eine EcoRI-Schnittstelle (unterstrichen in

- 15 Y1) am 5'-Ende der cDNA durch den Primer

Y1: 5'-GGA ATT CAA ACA AAT GAC GTC CGT TAA CGT AAA GCT-3' (sense)

- eingeführt. Ein 522 bp langes Fragment mit der 509 bp langen kodierenden Region der cDNA  
20 und der 13 bp langen 5'-UTR wurde mittels PCR unter Verwendung des Primerpaars Y1/Y2 amplifiziert und im Agarosegel gereinigt; der Primer Y2 hatte die Sequenz

Y2: 5'-TCT AGC GCA CCA ATG ATA AC-3' (antisense).

- 25 Das Fragment wurde in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert; der entstandene Vektor wurde mit pNK51 bezeichnet. Die letzten 1,3 kb der cDNA wurden mit ApaI ausgeschnitten und in pNK51, ebenfalls mit ApaI verdaut, ligiert; das entstandene Plasmid wurde pNK52 genannt. Für die Fusion der cDNA mit dem Promotor des Napin-Gens



- gNA aus *B. napus* (Scofield and Crouch (1987) J. Biol. Chem. 262:12202-12208) wurde ein 2,2 kb langes PstI/HindIII-Fragment mit dem Napin-Promotor aus pGEM-Nap ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des pBluescript KS<sup>+</sup>-Vektors (Stratagene) ligiert; der entstandene Vektor wurde pNK53 genannt. Ein 1,7 kb langes Fragment mit der kodierenden
- 5 Region der cDNA und ihrem 3'-PolyA-Signal wurde aus pNK52 mit SpeI/BsmI ausgeschnitten und die Enden mit Klenow aufgefüllt. Das resultierende Fragment mit blunt-Enden wurde downstream von dem Napin-Promotor in pNK53, der zuvor mit HindIII verdaut und ebenfalls mit Klenow behandelt worden war, eingeführt, um pNK54 zu ergeben. Ein 3,9 kb-Fragment mit dem chimären KCS-Gen wurde dann in den SpeI/SalI-verdauten binären
- 10 Vektor pRE1 kloniert, um pNK55 zu liefern. pRE1 weist ein chimäres Neomycin-Phosphotransferase-Gen als Selektionsmarker auf, wobei auch jeder andere für die Transformation von Pflanzen geeignete Vektor und insbesondere jeder andere binäre Vektor eingesetzt werden kann. Für ein Tandemkonstrukt wurde ein 3,3 kb langes SpeI-Fragment, enthaltend ein chimäres *Limnanthes douglasii* LPAAT-Gen, aus pRESS (Weier *et al.* (1997)
- 15 Fett/Lipid 99:160-165) ausgeschnitten und dann in SpeI-verdauten pNK55 ligiert, wodurch das Konstrukt pNKAT55 entstand.

- Für die Konstruktion von Fusionen der für KCS kodierenden Region mit dem Promotor des Acyl-ACP-Thioesterase-Gens FatB<sub>4</sub> aus *Cuphea lanceolata* wurde ein 1,7 kb langes
- 20 EcoRI/XhoI-BCS-Fragment aus pNK54 zwischen den FatB<sub>4</sub>-Promotor und seinem Terminationssignal in einem geeigneten Vektor eingefügt. Ein 5,2 kb-Fragment, enthaltend das chimäre KCS-Gen, wurde mit SfiI ausgeschnitten, seine Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend in pRE1 oder pRESS (Weier *et al.*, *supra*), verdaut mit SmaI, kloniert, wodurch die Vektoren pRTK55 bzw. pRSTK55 entstanden.

25

Für die Herstellung von KCS-Tandemkonstrukten mit einem plsB-Gen, das für die sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase aus *E. coli* (Lightner *et al.* (1980) J. Biol. Chem. 19:9413-9420; Lightner *et al.* (1983) J. Biol. Chem. 258:10856-10861) kodiert, wurden zwei

- 25 -

Restriktionsschnittstellen, KpnI (unterstrichen in AT1) und MscI (unterstrichen in AT2), mit den zwei Primern

AT1: 5'-CGG GGT ACC GGC GGC CGC TCT AG-3' (sense)

5 bzw.

AT2: 5'-CGT GGC CAG CCG GCC ATG GTA ATT GTA AAT G-3' (antisense)

- eingeführt. Ein 280 bp langes PCR-Fragment, enthaltend einen samenspezifischen DC3-Promotor aus Karotte (Seffens *et al.* (1990) Dev. Genet. 11:65-76) und eine Leadersequenz  $\Omega$  aus Tabakmosaikvirus (Gallie *et al.* (1987) Nucl. Acids Res. 15:3257-3273) wurde in pGEM-T (Promega) kloniert, um pGEM-DC3 zu ergeben. Ein 3,0 kb langes HindIII/SmaI-Fragment, enthaltend die 2,5 kb lange plsB-kodierende Region, die 0,25 kb Ocs-Terminationssequenz sowie die 0,25 kb lange 5'-UTR, wurde aus pHAMPL4 (Wolter *et al.* (1992) EMBO J. 11:4685-4692) ausgeschnitten und in HindIII/HincII-verdautes pBluescript KS<sup>+</sup> kloniert. Die
- 15 0,25 kb lange 5'-UTR wurde durch Verdau mit KpnI/MscI entfernt, und ein 300 bp langes DC3 $\Omega$ -Fragment von pGEM-DC3 wurde dann eingefügt, um pDC3-1AT zu ergeben. Das entstandene chimäre Gen (3,1 kb) wurde in den mit SpeI-verdautes Pflanzenexpressionsvektor pNK55 ligiert, um pNKDA55 zu liefern. Für die plsB-Gen-Fusion mit dem Napin-Promotor wurde ein 2,8 kb langes NcoI/NotI-Fragment, enthaltend die plsB-
- 20 kodierende Region und den Ocs-Terminator von pDC3-1AT, in den mit den gleichen Enzymen doppelverdautes Vektor pGEM-T (Promega) ligiert. Das entstandene Plasmid pGEM-1AT wurde mit ApaI/NotI geschnitten, mit Klenow behandelt und das Fragment mit blunt-Enden in pNK53, mit HindIII verdaut und mit Klenow behandelt, downstream von dem Napin-Promotor eingefügt. Das entstandene chimäre Gen (5,0 kb) wurde mit SpeI
- 25 ausgeschnitten und in den ebenfalls mit SpeI verdautes Vektor pNK55 ligiert, um pNKNA55 zu ergeben.

- 26 -

Wie erwähnt, sind die hergestellten Pflanzenexpressionskonstrukte in Abbildung 3 schematisch dargestellt; ProNap = Napin-Promotor, ProFatB4 = FatB4-Promotor, ProDC3 = DC3-Promotor, AT2Lim = *Limnanthes* LPAAT-cDNA, KCSRaps = Raps-KCS-cDNA, AT1Ecl = *E. coli* GPAT-Gen, T Kcs, T Fat, T Nap und T Ocs = polyA-Signale von KCS, FatB4, Napin (nap) bzw. *Agrobacterium* Octopin-Synthase (Ocs).

Die erste Gruppe der für die Herstellung transgener Pflanzen eingesetzten Konstrukte besteht somit aus Einzelkonstrukten, in denen die KCS-cDNA unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, entweder des Napin-Gens gNA aus *B. napus* (Scofield *et al.*, *supra*) oder des Acyl-ACP-Thioesterase-Gens FatB4 aus *Cuphea lanceolata*, steht.

Die zweite Gruppe von Konstrukten besteht aus Doppel- oder Tandemkonstrukten, die ein chimäres KCS-Gen in Kombination mit der kodierenden Sequenz entweder der sn-1-Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase von *L. douglasii* (LPAAT) (Hanke *et al.* (1995) Eur. J. Biochem. 232:806-810) oder der sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) aus *E. coli*, unter Kontrolle entweder des Napin-Promotors oder des FatB4-Promotors oder des DC3-Promotors von Karotte (Seffens *et al.*, *supra*) plus einer 5'-Leadersequenz ( $\Omega$ ) von Tabakmosaikvirus (Gallie *et al.*, *supra*), enthalten (siehe Abbildung 3, B). Diese Konstrukte wurden in geeignete binäre Vektoren eingeführt und für die Rapstransformation auf *Agrobacterium tumefaciens* (Stämme GV3101/pMP90, Koncz and Schell (1986) Mol. Gen. Genet. 204:383-396, und C58ATHV/pEH101, Hood *et al.* (1986) J. Bacteriol. 168:1291-1301) übertragen. Die Einzelkonstrukte wurden auf die LEAR-Sorte Drakkar und die Doppelkonstrukte auf die HEAR-Linie RS306 übertragen.

Die Transformation erfolgte mittels Cokultivierung von Hypokotyl-Explantaten mit transformierten Agrobakterien, und die transgenen Sprosse wurden auf Kanamycin-haltigem Medium nach Standardmethoden selektiert (siehe De Block *et al.* (1989) Plant Physiol.

91:694-701). Transgene Pflanzen wurden mittels Southern Blot-Analyse unter Verwendung geeigneter Sonden auf Anwesenheit der gewünschten Gene überprüft.

- Reife Samen von transgenen, selbstbestäubten LEAR-Drakkar-Pflanzen, enthaltend die
- 5 Napin-KCS- oder FatB<sub>4</sub>-KCS-Konstrukte, wurde gesammelt, und gepoolter T2-Samen für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzungen der Samenöle eingesetzt. Die gesammelten Daten sind in der unten stehenden Tabelle 1 zusammengefaßt. Tabelle 1 gibt die Fettsäurezusammensetzung von gepoolten T2-Samen von transgenen LEAR-Drakkar-Pflanzen und von Drakkar-Kontrollpflanzen (ck) wieder. T-NK steht für T2-Samen von
- 10 Napin-KCS-Pflanzen, während T-RTK T2-Samen von FatB<sub>4</sub>-KCS-Pflanzen identifiziert.

Tabelle 1

Pflanze	Gewichtsprozent von Fettsäuren							VLCFA
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	
Drak (ok)	3.0	1.9	66.7	15.2	8.5	1.9	0.1	0.3
T-NK-4	3.1	2.2	65.1	9.8	4.6	7.3	5.6	0.4
T-NK-5	3.5	2.9	66.1	9.7	4.5	8.3	3.4	0.3
T-NK-10	3.1	2.5	65.8	9.7	4.4	8.0	4.1	0.4
T-NK-11	3.5	2.4	63.9	10.2	4.6	9.3	3.9	0.4
T-NK-13	3.3	2.3	61.7	9.3	4.4	11.1	5.9	0.5
T-NK-14	3.3	2.7	69.9	11.6	4.6	4.2	1.7	0.3
T-NK-15	2.9	1.9	54.7	8.6	5.5	15.1	9.1	0.5
T-NK-16	3.4	2.2	67.3	9.6	4.9	8.5	2.2	0.4
T-NK-18	3.4	2.5	67.6	9.1	4.7	8.7	2.3	0.4
T-NK-20	3.1	3.5	47.2	6.6	3.5	14.8	15.5	0.7
T-NK-21	3.5	2.6	67.2	9.9	3.9	7.8	2.5	0.3
T-NK-24	3.3	2.3	73.4	9.1	4.2	4.4	1.3	0.3
T-NK-26	3.1	2.3	61.8	12.5	6.7	9.0	2.1	0.2
T-NK-27	4.1	1.8	58.6	18.6	8.0	4.9	1.6	0.5
T-NK-30	2.9	1.8	58.2	11.4	6.5	12.6	4.1	0.4
T-NK-32	2.9	2.1	55.0	10.9	6.6	14.2	5.6	0.5
T-NK-33	3.5	2.5	60.6	11.2	7.0	7.2	5.1	0.5
T-NK-34	3.3	1.6	60.3	15.4	8.0	7.2	1.6	0.5
T-NK-35	2.6	3.2	55.4	6.2	4.1	16.4	6.7	0.6
T-NK-38	2.9	2.6	69.5	7.0	4.3	8.5	3.0	0.4
T-NK-40	3.1	1.8	65.5	11.1	7.3	6.4	2.3	0.4
T-NK-41	3.2	2.7	59.6	9.7	5.7	11.7	4.8	0.5
T-NK-42	3.6	2.0	60.4	14.4	8.3	6.9	1.8	0.4
T-NK-43	3.4	1.4	59.8	14.7	10.3	7.0	1.3	0.4
T-NK-47	3.2	1.8	59.9	14.7	8.7	7.6	1.6	0.4
T-NK-49	0.3	1.8	54.1	10.8	7.3	12.8	7.5	0.7
T-NK-50	2.8	2.4	64.1	9.1	5.4	9.4	2.9	0.5
T-NK-65	2.9	2.2	57.1	9.5	6.0	14.6	5.4	0.5
T-NK-71	3.7	2.6	66.3	11.4	8.0	3.6	1.7	0.4
T-NK-82	3.7	2.7	61.5	10.3	5.9	11.1	4.2	0.2
T-NK-85	3.9	2.3	56.8	14.9	8.6	8.8	2.7	0.4
T-RTK-2	3.6	2.6	67.9	10.6	4.7	7.5	1.5	0.4
T-RTK-94	3.1	2.2	64.2	9.9	5.7	8.5	1.6	0.4

Das Samenöl der Wildtyppflanzen enthielt weniger als 3% VLCFA, während in der Fettsäurezusammensetzung von transgenen Samenölen bis zu 18% 20:1<sup>Δ11</sup> und bis zu 16% 20:1<sup>Δ13</sup> nachweisbar waren. Der Gehalt an 24:1 erreichte in den transgenen Samenölen maximal 0,9%. Während 22 von 44 Napin-KCS-Pflanzen hohe VLCFA-Konzentrationen im Bereich von 11 bis 31% aufwiesen, erreichten nur 2 von 70 FatB4-KCS-Pflanzen einen Gehalt von ungefähr 10% VLCFAs. Allgemein wurde der Anstieg an VLCFAs durch eine Erniedrigung des Gehalts an ungesättigten C18-Fettsäuren begleitet, während der Gehalt an 16:0 und 18:0 kaum verändert war. Die Unterschiede in den VLCFA-Mengen in den Samenölen unabhängiger Transformanten dürften auf verschiedene KCS-Expressionsraten zurückzuführen sein. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß die cDNA aus *B. napus* tatsächlich für eine  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, die beide Elongationsschritte von 18:1 zu 22:1 katalysiert, die aber gegenüber 22:1-CoA als Substrat kaum aktiv ist. Die Einführung nur einer KCS als einziges Condensing-Enzym resultiert in signifikanten Mengen an VLCFAs, was bedeutet, daß die drei anderen Enzyme, die für die Synthese von VLCFAs erforderlich sind, nämlich die oben erwähnten zwei Reduktasen und die Dehydratase, im mikrosomalen Elongationssystem von Drakkar-Pflanzen funktionell vorhanden sein müssen.

Da T2-Samen für jedes T-DNA-Insert aufspalten, konnte man davon ausgehen, daß einzelne, für das T-DNA-Insert homozygoten Samen einen höheren VLCFA-Gehalt aufweisen. Einzelne Kotedonon von T2-Samen von drei transgenen Pflanzen (T-NK-13, -15 und -20) wurden daher für weitere Analysen der Fettsäurezusammensetzung eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt, die die Verteilung des VLCFA-Gehalts in einzelnen T2-Samen von transgenen LEAR-Drakkar-Pflanzen zeigt. (A) VLCFA-Gehalt von 44 individuellen Samen von Pflanze T-NK-13, (B) VLCFA-Gehalt von 45 individuellen Samen von Pflanze T-NK-15 und (C) VLCFA-Gehalt von 42 individuellen Samen von Pflanze T-NK-20. Wie erwartet wiesen, verursacht durch Gen-Dosis-Effekte, bestimmte Einzelsamen deutlich höhere VLCFA-Gehalte auf, als die, die in gepoolten Samenölfractionen gemessen wurden. In T2-Samen der Transformante T-NK-13 zeigten 12 von 44 Samen einen fast

zweifach höheren VLCFA-Gehalt als die gepoolten T2-Samen, während 13 Samen das Fettsäuremuster des Wildtyps aufwiesen. Diese Daten zeigen, daß ein T-DNA-Locus in der Primärtransformante von T-NK-13 vorhanden war. Andererseits deutet die Analyse der Transformanten T-NK-15 und T-NK-20 darauf hin, daß diese mindestens drei aktive Kopien des Transgens enthielten, da nur einer von 45 Samen einen in T-NK-15 und kein einziger Samen von 42 in T-NK-20 einen LEAR-Genotyp zeigte. In Einzelsamen von T-NK-20 konnten bis zu 28% 22:1<sup>Δ13</sup> und 45% VLCFA nachgewiesen werden. Weiter zeigte die Samenölanalyse, daß das Verhältnis von 22:1/20:1 in hohem Maße von der Aktivität des eingeführten KCS-Enzyms abhängig ist, was sich in dem Gesamt-VLCFA-Gehalt in den Samenölen widerspiegelte. 22:1/20:1-Verhältnisse von > 1 konnten nur bei VLCFA-Gehalten von über 39% beobachtet werden (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5). Abbildung 5 zeigt die Fettsäurezusammensetzung von T2-Einzelsamen von transgenen LEAR-Drakkar-Pflanzen, im Vergleich zu Kontrollpflanzen (ck); NK13-4 = Samen einer T-NK-13-Pflanze, NK15-3 = Samen einer T-NK-15-Pflanze, NK20-8 = Samen einer T-NK-20-Pflanze.

Um den Gehalt an Erucasäure in Triacylglyceriden auf der Grundlage von HEAR-Phenotypen zu erhöhen, ist es notwendig, nicht nur den Gehalt an 22:1 im CoA-Samenpool zu erhöhen, sondern den 22:1-Gehalt auch in das Öl und das Sink für Fettablagerung zu kanalisieren. Zu diesem Zweck wurden die oben beschriebenen Expressionsvektoren konstruiert, in denen die Raps-KCS in Kombination mit entweder LPAAT (von *L. douglasii*) mit dem Ziel der Manipulation der Kanalisierung von 22:1 in die sn-2-Position des Samenöls oder GPAT (von *E. coli*) mit dem Ziel der Erhöhung der Sinkkapazität für Fettablagerung, unter der Kontrolle von entweder dem Napin-Promotor oder dem FatB4-Promotor oder dem DC3-Promotor, vorliegt. Die Konstrukte, NKAT (napin-KCS-napin-LPAAT), RSTK (FatB4-KCS-napin-LPAAT), NKDA (napin-KCS-DC3-GPAT) und NKNA (napin-KCS-napin-GPAT) wurden auf die HEAR-Linie RS306 übertragen. Gepoolte T2-Samen von transgenen RS306-Pflanzen wurden hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung analysiert, die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. RS306 (ck) identifiziert das Samenöl von RS306-

- 31 -

Kontrollpflanzen, die mit dem leeren Vektor pRE1 transformiert wurden. T-NKAT repräsentiert T2-Samen von NKAT-Pflanzen, T-RSTK T2-Samen von RSTK-Pflanzen, T-NKDA T2-Zellen von NKDA-Pflanzen und T-NKNA T2-Samen von NKAT-Pflanzen.

5

Tabelle 2

<u>Gewichtsprozent von Gesamtfettsäuren TAGSpezies</u>										
Pflanze	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	C22:1	C24:1	EIEE	EEE
10										
RS306 (ck)	2.5	1.3	15.7	10.8	4.1	6.5	53.7	1.9	-	-
T-NKAT-1	2.4	1.1	13.3	11.5	5.1	7.0	55.0	1.6	2.8	2.9
T-NKAT-5	2.3	1.3	13.0	10.1	4.1	6.3	56.7	1.6	3.0	3.7
T-NKAT-6	2.1	1.0	11.8	10.4	5.3	8.2	55.5	1.5	4.3	4.1
T-NKAT-7	2.0	0.9	12.7	10.8	4.4	8.3	55.3	1.5	4.2	4.1
T-NKAT-14	2.1	0.9	11.9	11.6	5.4	6.1	55.9	1.7	3.8	4.3
15										
T-RSTK-13	2.1	0.8	11.1	11.1	6.4	5.9	56.7	1.9	4.3	5.6
T-RSTK-15	2.0	1.0	14.5	10.7	4.1	7.0	55.3	1.6	3.5	2.9
T-NKDA-5	1.9	1.2	12.1	11.0	4.9	6.4	58.2	2.0	-	-
T-NKDA-7	2.3	1.2	11.4	10.0	5.1	5.2	59.6	2.3	-	-
T-NKDA-15	1.9	1.2	11.1	11.2	4.5	5.8	58.7	2.1	-	-
T-NKDA-16	1.8	1.2	12.5	11.3	4.9	5.3	58.0	1.9	-	-
T-NKDA-9	2.1	1.4	11.7	11.2	4.5	5.7	57.0	2.7	-	-
20										
T-NKDA-4	1.9	0.9	10.0	13.5	5.9	5.1	57.6	1.8	-	-
T-NKNA-3	1.6	1.0	12.8	11.0	5.0	5.4	58.7	2.0	-	-
T-NKNA-15	2.0	1.3	10.7	12.4	5.4	4.8	56.3	2.4	-	-
T-NKNA-20	1.8	1.1	16.1	8.7	4.3	8.1	56.4	1.7	-	-

25

In Tabelle 2 steht „EIEE“ für Triacylglycerid mit einem Eicosensäure-Rest (20:1) und zwei Erucasäure-Resten (22:1). „EEE“ steht für Trierucin, also Triacylglycerid mit drei Erucasäuren.



- 32 -

In T2-Samenölen konnte ein leichter Anstieg im 22:1-Gehalt beobachtet werden, der im Bereich von 2,6 bis 5,9%, verglichen mit dem von RS306-Kontrollpflanzen, lag. Die transgenen Pflanzen akkumulierten 2,9-5,6% Trierucin (EEE) in ihrem Samenöl. Der Anteil von 22:1 an der sn-2-Position im Triacylglycerid (TAG) erreichte 31,7-37,5% in den transgenen Samenölen, während der Anteil in den Kontrollsamensamen weniger als 1% der sn-2-Fettsäuren ausmachte. Diese Ergebnisse zeigten, daß die eingeführten KCS- und LPAAT-Gene in den transgenen Pflanzen funktionell exprimiert wurden. Weiter lassen die in Tabelle 2 gezeigten Daten vermuten, daß maximal ein Gehalt von 22:1 von 60-65% in HEAR-Pflanzen erreicht werden kann.

#### Beispiel 4: Analyse des Raps-KCS-Promotors

Im Rahmen der Vervollständigung des Bereichs des Startkodons der KCS-cDNA wurde, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, eine inverse PCR durchgeführt und verschiedene 5'-flankierende Sequenzen der KCS-kodierenden Region mit einer Länge von ~ 1,5 kb aus der genomischen DNA von drei verschiedenen Rapsorten (*B. napus* cv. Askari, Drakkar und RS-Linie 306) isoliert. Sequenzanalysen zeigten, daß die Promotorsequenzen dieser Klone identisch waren, weshalb ein aus Askari isolierter Promotor für die weitere Analyse ausgewählt wurde.

Abbildung 6 zeigt die Sequenz des KCS-Promotors aus Raps (SEQ ID Nr. 2); die Sequenz umfaßt insgesamt 1468 Basen. Das 5'-Ende der gezeigten Sequenz entspricht dem Nukleotid -1429 des KCS-Gens, am 3'-Ende umfaßt die gezeigte Sequenz die Kodons 1 (Methionin) bis 13 (Valin) der KCS-kodierenden Sequenz. Das ATG-Startcodon, die CAAT-Box sowie die TATA-Box sind eingezeichnet.

Ähnlichkeiten der KCS-Promotorregion mit irgendwelchen anderen Promotorsequenzen, die in den Datenbanken erhältlich sind, wurden nicht beobachtet.

Der KCS-Promotor zeigt nicht nur die für samenspezifische Promotoren typischen AT-reichen Elemente (19 Elemente mit einer Länge zwischen 6 und 19 bp im Bereich zwischen -1 und -471), sondern auch verschiedene andere Motive im Bereich -99 bis -137, die eine gewebespezifische Regulation vermuten lassen. Ein RY-Repeat (CATGCATG) liegt zwischen der CAAT-Box und der TATA-Box, und eine E-Box (CACATG) befindet sich direkt neben der TATA-Box.

10

Für die Analyse der funktionellen und gewebespezifischen Expression in transgenen Rapspflanzen wurde die 1,5 kb lange Promotorregion des KCS-Gens mit dem für  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodierenden Reportergen uidA (Jefferson *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405; Jefferson *et al.* (1989) EMBO J. 6:3901-3907) in dem binären Vektor pBI101.2 (Clontech, CA; Jefferson *et al.*, *supra*) fusioniert. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine PCR unter Verwendung folgender Primer durchgeführt:

IP6:5'-CTC TCG AAT TCA ATA CAC ATG-3'(sense)  
und  
20 IP8:5'-TCC CCC GGG TGC TCA GTG TGT GTG TCG-3'(antisense),

wobei IP6 mit der Promotorregion überlappt und der Reverseprimer IP8 eine eingeführte SmaI-Schnittstelle (unterstrichen) für die Klonierung enthielt. Ein 470 bp PCR-Fragment wurde in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert und sequenziert. Das PCR-Fragment wurde 25 mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NcoI ausgeschnitten und in das 3'-Ende des mit den gleichen Enzymen geschnittenen Promotors ligiert. Schließlich wurde ein

- 34 -

1,5 kb-Promotorfragment mit den Restriktionsenzymen HindIII und SmaI ausgeschnitten und vor die GUS-kodierende Region im pBI101.2 eingefügt. Das hieraus entstandene Konstrukt wurde mit pBnKCS-Prom bezeichnet.

- 5 Das Promotor/GUS-Konstrukt wurde auf *B. napus* RS306 übertragen, und unreife Samen in verschiedenen Entwicklungsstadien und andere Gewebe von transgenen Pflanzen wie Kontrollpflanzen wurden für die GUS-Analyse eingesetzt. Die histochemische GUS-Anfärbung zeigte GUS-Aktivität nur in sich entwickelnden Samen von transgenen Pflanzen, aber nicht in Wurzeln, Stengeln, Blättern, Knospen und Blüten und auch nicht in Organen der
- 10 Kontrollpflanzen. In transgenen Samen war GUS-Expression erstmals am 16. Tag nach der Bestäubung im histochemischen Test sichtbar und wurde bis zum 30. Tag nach Bestäubung stärker, was dem Expressionsmuster des nativen KCS-Gens entspricht. Die quantitative Analyse mittels Chemilumineszenz bestätigte die histochemischen Ergebnisse. In transgenem Samen, der am 25. und 30. Tag nach Bestäubung geerntet wurde, konnten GUS-Aktivitäten
- 15 von bis zu 180 bzw. 324  $\mu\text{mol/min/mg}$  Protein gemessen werden. Diese Daten beweisen, daß die in Abbildung 6 gezeigte Promotorregion einen neuen, sehr aktiven samenspezifischen Promotor mit hoher Expressionsrate in transgenen Rapspflanzen darstellt.
- 20 Beispiel 5: Expression von KCS aus *B. napus* in Hefe

Um die Funktion und Aktivität der durch die verschiedenen isolierten KCS-Gene aus Askari, Drakkar und der RS-Linie 306 kodierten KCS vergleichen zu können, wurden die Gene in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSC1 (Invitrogen) unter der Kontrolle eines

- 25 Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors exprimiert.

Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen isolierten KCS-Sequenzen in dem Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen, CA) mit dem GAL1-Promotor fusioniert. Ein 1,7

- kb BnKCSa-Fragment aus der cDNA-Bibliothek von *B. napus* cv. Askari wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI ausgeschnitten und in mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pYES2 eingefügt, wodurch der Vektor pYES-BnKCSa entstand. Für die anderen beiden Hefeexpressionskonstrukte wurde ein 0,8 kb HindIII-Fragment von BnKCSa durch das von BnKCSd, also die genomische DNA-Sequenz von *B. napus* cv. Drakkar ersetzt. Das resultierende 1,7 kb chimäre BnKCSd-Gen wurde in EcoRI/XhoI-verdauten Vektor pYES2 eingefügt, wodurch der Vektor pYES-BnKCSd entstand. Für das letzte Konstrukt, nämlich den Hefeexpressionsvektor enthaltend die genomische KCS-Sequenz der Linie RS306 wurde ein 0,9 kb ClaI/EcoRV-Fragment von BnKCSa durch das von BnKCSr (KCS-Sequenz aus der Linie RS306) ersetzt. Die Plasmid-DNAs wurden aus dem *E. coli*-Stamm SCS110 (Stratagene) isoliert. Das entstandene chimäre BnKCSr-Gen (1,7 kb) wurde in EcoRI/XhoI-verdauten pYES2 eingefügt, um pYES-BnKCSr zu ergeben.
- INVSC1-Zellen mit dem Plasmid pYES2 ohne Insert wurden als Wildtyp-Kontrolle verwendet. Die Fettsäurezusammensetzung der Hefezellen wurde mittels Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC) bestimmt, und die Bestandteile von VLCFAs wurden weiter mittels GLC-MS-Analyse (GLC-Massenspektrometrie) identifiziert. Beträchtliche Mengen an VLCFAs wurden in den transgenen Hefezellen mit der KCS-Sequenz aus Askari gefunden, während die transgenen Hefezellen, die die KCS-Sequenzen aus Drakkar bzw. der RS-Linie exprimierten, Fettsäurezusammensetzungen zeigten ähnlich den Kontrollzellen (siehe auch Tabelle 3). In Zellen mit der KCS-Sequenz aus Askari wurden bis zu 41% VLCFAs in den Fettextrakten detektiert, in denen 22:1-Fettsäuren mit Doppelbindung in entweder der Position  $\Delta 15$  oder  $\Delta 13$  vorherrschten, aber auch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren mit mehr als 22 C-Atomen ebenfalls in nennenswerten Mengen detektiert werden konnten. Diese Daten zeigen, daß das KCS-Gen von Askari, anders als die KCS-Gene von Drakkar oder der RS306-Linie, in Hefe funktionell exprimiert wurde und mit den Bestandteilen des Hefe-Elongase-Komplexes effektiv zusammenwirkte. Weiter zeigen die Daten, daß diese in Hefe exprimierte KCS eine relativ breite Acyl-CoA-Spezifität besitzt.

Wie in Abbildung 7A dargestellt, verwendet die KCS nicht nur 18:1<sup>Δ9</sup>-, sondern auch 16:1<sup>Δ9</sup>-Acylgruppen als Substrat. Da Hefezellen zweimal mehr 16:1<sup>Δ9</sup> als 18:1<sup>Δ9</sup> akkumulieren, scheint die KCS beide Acylgruppen in ähnlichem Ausmaß zu verwenden. Zusätzlich zeigte  
5 die Fettsäureanalyse von transgenen Hefezellen, daß die eingeführte KCS aus Askari die Elongation von 18:0 derart bewirkt, daß 26:0 als Hauptprodukt gebildet wird. Somit scheint die Fähigkeit der Askari-KCS, C20- und C22-Acylgruppen zu verlängern, deutlich höher mit gesättigten als mit einfach ungesättigten Acyl-CoA-Thioestern zu sein. Insgesamt zeigen die Daten, daß die KCS aus Askari äußerst aktiv in Hefe ist und zudem in der Lage ist, vier bis  
10 fünf Elongationsschritte in Hefe zu katalysieren. Hier scheint die KCS aus *Brassica napus* der KCS aus *A. thaliana*, die nur zwei bis drei Elongationsschritte katalysiert, deutlich überlegen zu sein.

Wie oben erwähnt, konnte kein VLCFA-Gehalt in Hefezellen, transformiert mit KCS aus  
15 Drakkar, detektiert werden. Wie bereits erwähnt, zeigen die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen nur einen Unterschied in Position 282, nämlich daß Serin in Drakkar in dieser Position durch Phenylalanin ersetzt ist. Dieser Aminosäureaustausch könnte ein katalytisch inaktives Protein hervorrufen und dadurch den LEAR-Phenotyp der Sorte Drakkar bewirken. Dies wird auch durch Daten der Analyse des Samenöls von transgenen Drakkar-Pflanzen  
20 bestätigt, die zeigen, daß der Phenotyp mit höherem Erucasäuregehalt durch Einführung des KCS-Gens aus Askari wiederhergestellt werden kann.

Die untenstehende Tabelle 3 zeigt die Fettsäurezusammensetzung von Wildtyp-Kontroll- und transformierten Hefezellen. YES2 = Wildtyp-Kontrolle; BnKCSa = Hefezellen, transformiert  
25 mit Askari BnKCS; BnKCSd = Hefezellen, transformiert mit Drakkar BnKCS; BnKCSr = Hefezellen, transformiert mit RS306 BnKCS. Die Werte geben den Gehalt an einer bestimmten Fettsäure als prozentualen Anteil (w/w) des Gesamtfettsäuregehalts wieder.

Tabelle 3

	Fettsäure	YES2	BnKCSa	BnKCSd	BnKCSr
5	16:0	22.83	8.51	23.78	23.08
	16:1 <sup>A9</sup>	45.79	31.34	44.90	44.27
	18:0	6.20	2.68	7.06	6.61
	18:1 <sup>A9</sup>	24.00	9.17	22.97	24.55
	18:1 <sup>A11</sup>	-	1.93	-	-
10	20:0	-	1.87	-	-
	20:1 <sup>A11</sup>	-	0.38	-	-
	22:0	-	2.28	-	-
	22:1 <sup>A13</sup>	-	6.87	-	-
	22:1 <sup>A15</sup>	-	11.57	-	-
15	24:0	-	3.53	-	-
	24:1 <sup>A15</sup>	-	0.86	-	-
	24:1 <sup>A17</sup>	-	3.21	-	-
	26:0	-	8.40	-	-
	26:1 <sup>A17</sup>	-	0.30	-	-
	26:1 <sup>A19</sup>	-	1.79	-	-

- 20 Die nachstehende Abbildung 7 enthält Daten der Expression von BnKCSa in Hefe, wobei (A) verschiedene Synthesewege für verschiedene VLCFAs zeigt; (B) die Fettsäurezusammensetzungen von Hefezellen, transformiert mit BnKCSa, zeigt; und (C) die erhöhten Anteile verschiedener VLCFA-Spezies am Gesamtfettsäuregehalt wiedergibt.
- 25 Lipidextraktionen und Fettsäureanalysen wurden nach Standardverfahren durchgeführt, siehe z.B. Browne et al. (1986) Anal. Biochem. 152: 141-145, wobei die Fettsäuremethylester weiter durch GC-MS-Analyse unter Verwendung ihrer Nikotinat- und Di-O-

- 38 -

Trimethylsilylether-Derivate identifiziert wurden (Dommes et al. (1976) J. Chromatogr. Sci. 14: 360-366; Murata et al. (1978) J. Lipid Res. 19: 172-176).

- 5 Beispiel 6: Fettsäurefütterungsexperimente mit transgenen Hefezellen, die die KCS aus *B. napus* exprimieren

- Um die Substratspezifitäten der in Hefezellen exprimierten KCS aus *B. napus* zu analysieren, wurden Fütterungsversuche mit verschiedenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren  
10 durchgeführt. Für diese Versuche wurden die transgenen Hefezellen, wie in Beispiel 5 beschrieben, entwickelt und kultiviert. Bei einer optischen Dichte der Hefekulturen von 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 2% Galactose induziert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kulturen ebenfalls in Gegenwart von 0,1% Tergitol NP-40 mit verschiedenen Fettsäuren in einer Endkonzentration von 0,2 mM versetzt und 24 h bei 30°C weiter kultiviert  
15 (Kontrolle ohne Fettsäurezusatz). Schließlich wurden die Zellen geerntet und für die Fettsäureanalyse verwendet.

- Durch Kontrollexperimente wurde sichergestellt, daß Hefezellen selbst nicht in der Lage sind, die eingesetzten Substrate 18:2<sup>9,12</sup>, 18:3<sup>9,12,15</sup>, 18:3<sup>6,9,12</sup>, 20:3<sup>8,11,14</sup> und 20:4<sup>5, 8,11,14</sup> zu  
20 elongieren. Überraschenderweise wurden in solchen Hefezellen, in denen die KCS aus *B. napus* exprimiert wurde, je nach eingesetztem Substrat verschiedene Elongationsprodukte gefunden, die in Tabelle 4 unten aufgeführt sind. Diese gefundenen Elongationsprodukte sind auf die Aktivität der eingeführten KCS aus *B. napus* zurückzuführen.

- 39 -

Tabelle 4

Substrat	Substratakkumulation		Elongationsprodukte				Summe
	% Gesamtfettsäuren		% Gesamtfettsäuren				Elongationsprodukte
			20:X	22:X	24:X	26:X	(%)
18:2 <sup>9,12</sup>	45,7	2,1	3,1	0,1	0,1	5,4	
18:3 <sup>9,12,15</sup>	56,4	2,3	2,3	0,3	-	4,9	
18:3 <sup>6,9,12</sup>	61,3	0,7	0,1	0,1	0,4	1,3	
20:3 <sup>8,11,14</sup>	34,1	-	3,6	0,2	0,5	4,3	
20:4 <sup>5,8,11,14</sup>	31,8	-	2,2	0,1	0,6	2,9	

Aus den in Tabelle 4 zusammengefaßten Daten wird deutlich, daß die in den Hefezellen exprimierte KCS aus *B. napus* (BnKCSa) die exogen zugesetzten Fettsäuren, 18:2<sup>9,12</sup>, 18:3<sup>9,12,15</sup>, 18:3<sup>6,9,12</sup>, 20:3<sup>8,11,14</sup>, 20:4<sup>5,8,11,14</sup>, die von den Hefezellen aus dem Medium aufgenommen wurden, als Substrate nutzt und um 6 bis 8 C-Atome verlängert. Die mit 20:X, 22:X, 24:X und 26:X bezeichneten Produkte entsprechen den erwarteten Elongationsprodukten. Die korrekte Lage der Doppelbindungen wurde durch GC/MS sichergestellt.



## Ansprüche

1. Nukleinsäuresequenz,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) aus *Brassica napus* kodiert.
2. Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1,  
umfassend SEQ:ID No. 1 oder Teile davon oder kodierend für ein Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder Teile davon.
3. Promotorregion,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie natürlicherweise die Expression eines  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens kontrolliert.
4. Promotorregion gemäß Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie natürlicherweise die Expression eines pflanzlichen  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens kontrolliert.
5. Promotorregion gemäß Anspruch 3 oder 4,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Brassicaceen, insbesondere aus *Brassica napus* stammt.
6. Promotorregion gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5,  
umfassend SEQ ID Nr. 2 oder Teile davon, die die Transkription einer operativ verknüpften kodierenden oder nicht kodierenden Region gewährleisten.
7. Chimäres Gen,  
dadurch gekennzeichnet, daß es eine Promotorregion gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, operativ mit einer kodierenden Region verknüpft, umfaßt.

8. Nukleinsäuremolekül,  
dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz, eine Promotorregion oder ein  
5 chimäres Gen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt.
9. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 operativ  
verknüpft mit einem in Pflanzen aktiven, insbesondere einem samenspezifischen Promotor  
10 umfaßt.
10. Transgene Pflanzen,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäuresequenz, eine Promotorregion, ein  
chimäres Gen oder ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche  
15 enthalten, sowie Teile dieser Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten,  
Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die Nachkommen dieser  
Pflanzen.
11. Pflanzen gemäß Anspruch 10,  
20 bei denen es sich um Ölsaaten, insbesondere Raps, Rüpsen, Sonnenblume, Sojabohne,  
Erdnuß, Kokospalme, Ölpalme, Baumwolle, Lein handelt.
12. Verfahren zur Bereitstellung samenspezifischer Expression einer kodierenden Region in  
Pflanzenzellen, umfassend die Schritte:
- 25 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine Promotorregion gemäß einem der  
Ansprüche 3 bis 6 in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Region vorliegt,  
b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und

- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
13. Verfahren zur Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu längerkettigen Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten, umfassend die Schritte:
- 5 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 vorliegt,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
- 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
14. Verfahren zur Erhöhung des Verhältnisses von 22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten, umfassend die Schritte:
- 15 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 vorliegt,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
- 20 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
15. Verfahren zur Herstellung von längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Elongation kürzerkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen und Pflanzenzellen durch (i) Elongation von natürlicherweise vorkommenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder (ii) Elongation von aus der Umgebung aufgenommenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, umfassend die Schritte:
- 25 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus bzw. der Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer

Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,

- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- 5 c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert, die Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 ist.

17. Verfahren zur Herstellung von längerkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Elongation kürzerkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen und  
15 Pflanzenzellen durch Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in dem Mikroorganismus bzw. der Pflanzenzelle aufgrund der Expression eines oder mehrerer eingeführten Desaturase- oder/und Elongase-Gene erzeugt werden, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus bzw. der  
20 Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- 25 c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert, die Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 ist.
- 5 19. Verfahren zur Änderung der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Aktivität in transgenen Pflanzen durch Übertragung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 auf pflanzliche Zellen, falls erwünscht mit anschließender Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Pflanzen.
- 10 20. Verwendung einer Promotorregion gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6 zur Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzenteilen und/oder Pflanzenprodukten mit veränderter Genexpression.
21. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung von  
15 transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzenteilen und/oder Pflanzenprodukten mit einem gegenüber Wildtyppflanzen erhöhten Verhältnis von 22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren.
22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung von  
20 gegenüber Wildtyppflanzen hin zu länger-kettigen Fettsäuren verschobenen Fettsäuremuster.
23. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, zur Herstellung transgener Mikroorganismen oder Pflanzenzellen mit einem gegenüber den Ausgangsformen zu länger-kettigen Fettsäuren  
25 verschobenen Muster an mehrfach ungesättigten Fettsäuren.
24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei es sich bei der Nukleinsäuresequenz um eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 handelt.

1/8

Abbildung 1 (SEQ ID Nr.1)

```

                                agcgtaacggaccacaaaaga -21
ggatccatcacaaatcacatctcatcgcttcctctactattctccgacacacacactgagca -81
GP1 -
M T S I N V K L L Y H Y V I T N L F N L
atgacgtccATTAACGTAAAGCTCCTTTACCATTACGTACATAACCAACCTTTTCAACCTT 60
- IP1
C F F P L T A I V A G K A Y R L T I D D
TGCTTCTTTCCGTTAACGGCGATCGTCGCCGAAAAGCCTATCGGCTTACCATAGACGAT 120
L H H L Y Y S Y L Q H N L I T I A P L F
CTTCACCACTTATACTATTCTCTATCTCCAACACAACCTCATAACCATCGCTCCACTCTTT 180
A F T V F G S V L Y I A T R P K P V Y L
GCCTTCACCGTTTCGGTTCGGTCTCTACATCGCAACCCGGCCCAAACCGGTTTACCTC 240
V E Y S C Y L P P T H C R S S I S K V M
GTTGAGTACTCATGCTACCTTCACCAACGCATTGTAGATCAAGTATCTCCAAGGTCATG 300
D I F Y Q V R K A D P S R N G T C D D S
GATATCTTTTATCAAGTAAGAAAAGCTGATCCTTCTCGGAACGGCACGTGCGATGACTCG 360
S W L D F L R K I Q E R S G L G D E T H
TCGTGGCTTGACTTCTTGAGGAAGATTCAAGAACGTTCAAGTCTAGGCGATGAAACTCAC 420
G P E G L L Q V P P R K T F A A A R E E
GGGCCCCGAGGGCTGCTTCAGTCCCTCCCGGAAGACTTTTGGCGCGCGGTGAAGAG 480
T E Q V I I G A L E N L F K N T N V N P
ACGGAGCAAGTTATCATTGGTGGCGTAGAAAATCTATTCAAGAACACCAACGTTAACCCCT 540
K D I G I L V V N S S M F N P T P S L S
AAAGATATAGGTATACTTGTGGTGAACCTAAGCATGTTTAAATCCAATCCATCGCTCC 600
A M V V N T F K L R S N V R S F N L G G
CGGATGGTCTGTTAACACTTTCAAGCTCCGAAGCAACGTAAAGAAGCTTTAACCTTGGTGGC 660
V
IP3 -
M G C S A G V I A I D L A K D L L H V H
ATGGGTGTAGTGCCGGCGTTATAGCCATTGATCTAGCAAAGGACTTGTGTGATTCAT 720
K N T Y A L V V S T E N I T Y N I Y A G
AAAAATACGTATGCTCTTGTGGTGAGCAAGAGAACATCACTTATAACATTTACGCTGGT 780
D N R S H M V S N C L F R V G G A A I L
GATAATAGGTCCATGATGGTTTCAAATTGCTTGTTCGGTGTGGTGGGGCGGCTATTTTG 840
L S N K P G D R R R S K Y E L V H T V R
CTCTCCAACAACGCTGGAGATCGTAGACGGTCCAAGTACGAGCTAGTTCCACACGGTTCGA 900

```

2/8

Abbildung 1 Fortsetzung

T H T G A D D K S F R C V Q Q G D O E N  
 ACGCATACCGGAGCTGACGACAAGTCTTTTCGTTGCGTGCAACAGGAGACGATGAGAAC 960  
 G K I G V S L S K D I T D V A G R T V K  
 GGCAAAATCGGAGTGAGTTTGTCCAAGGACATAACCGATGTTGCTGGTGAACGGTTAAG 1020  
 K N I A T L G P L I L P L S E K L L F 'F'  
 AAAACATAGCAACGTTGGGTCGTTGATTCTTCCGTTAAGCGAGAACTTCTTTTTTTC 1080  
 V T F M G K K L F K D K I K H Y Y V P D  
 GTTACCTTCATGGGCAAGAACTTTTCAAAGATAAAATCAAACATTACTACGTCCCGGAT 1140  
 F K L A I D H F C I H A G G R A V I D V  
 TTCAAACTTGCTATTGACCATTTTTGATATACATGCCGGAGGCGAGCCGTGATTGATGT 1200  
 L E K N L A L A P I D V E A S R S T L H  
 CTAGAGAAGAACCTAGCCCTAGCACCGATCGATGTAGAGGCATCAAGATCAACGTTACAT 1260  
 R F G N T S S S S I W Y E L A Y I E A K  
 AGATTTGGAAACACTTCATCTAGCTCAATATGGTATGAGTTGGCATACATAGAAGCAAAA 1320  
 G R M K K G N K V W Q I A L G S G F K C  
 GGAAGGATGAAGAAAGTAATAAAGTTTGGCAGATTGCTTTAGGGTCAGGCTTTAAGTGT 1380  
 N S A V W V A L N N V K A S T N S P W E  
 AACAGTGCAGTTTGGGTGGCTCTAAACAATGTCAAAGCTTCGACAAATAGTCCTTGGGAA 1440  
 H C I D R Y P V K I D S D S G K S E T R  
 CACTGCATCGACAGTACCCGGTCAAAATTGATTCTGATTCAAGTAAGTCAGAGACTCGT 1500  
 V Q N G R S \*  
 GTCCAAAACGGTCGGTCCTATAATGATGTTTGCTCTCTTTCGTTCTTTTTATTGTT 1560  
 ATAATAATTGATGGCTACGATGTTTCTCTTGTTGTTATGATAAGAATGCAATGGTG 1620  
 TTCTAGTATTGATTGTTTTTACATGTATGTATCTCTTATTACATGAAATTTTTAAACGC 1680  
 b3  
 CTAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1704

### Abbildung 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)



Abbildung 3.

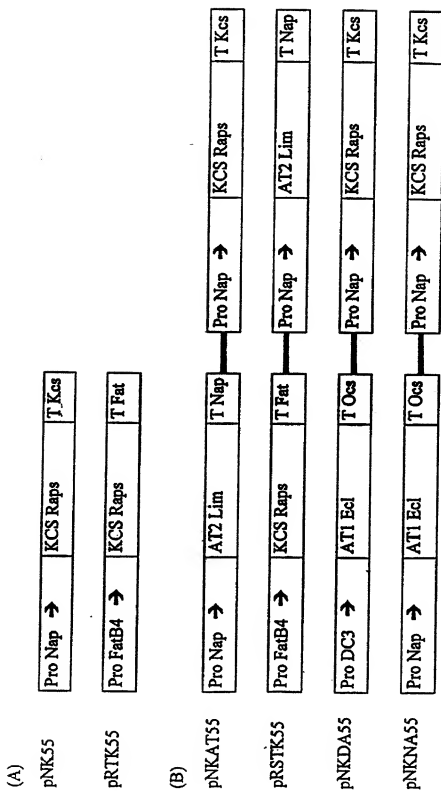
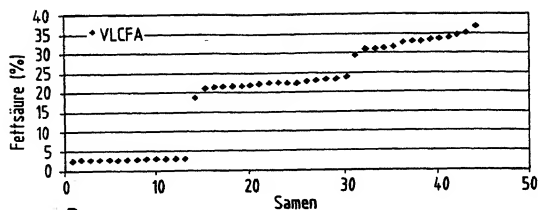
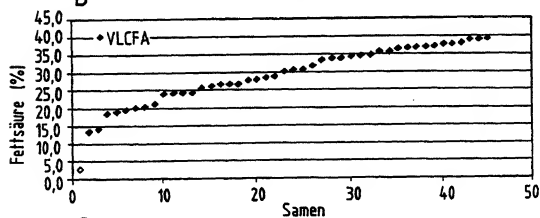


Abbildung 4

A



B



C

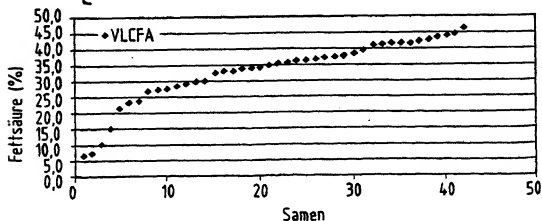


Abbildung 5

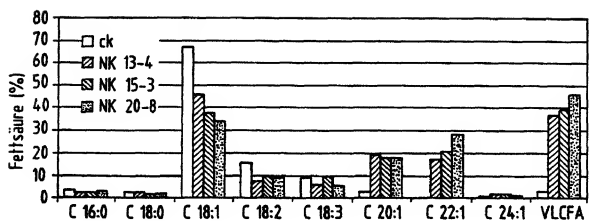


Abbildung 6 (SEQ ID Nr. 2)

```

AAGCTTT ACAACGATAC AC AAAA CTTA TAACCGTAAT
CACCATTCAT TAACTTAACT ACTATCACAT GCATTCATGA ATTGAAACGA GAAGGATGTA
AATAGTTGGG AAGTTATCTC CACGTTGAAG AGATCGTTAG CGAGAGCTGA AAGACCCGAGG
GAGGAGACGC CGTCAACACG GACAGAGTCG TCGACCCCTCA CATGAAGTAG GAGGAATCTC
CGTGAGGAGC CAGAGAGACG TCTTTGGTCT TCGGTTTCGA TCCTTGATCT GACGGAGAAG
ACGAGAGAAG TGCGACTGGA CTCCTGAGG ACCAACAGAG TCGCTCTCGG TTTCGATCGT
CGGTATTGGT GGAGAAGGCG GAGGAATCTC CGTGACGAGC CAGAGAGATG TCGTCGGTCT
TCGGTTTCGA TCCTTGATCT GACGGAGAAG ACGAGAGAAG TGCGACGAGA CTCCTGAGG
ACCAACAGAG TTGTCCTCGG TTTCGATCGT CGGTTTCGGC GGAGAAGGCG GAGGAATCTC
CGTGAGGAGC CAGAGAGACG TCGTTGGTCT TCGGTTTCGA TCCTTGATCT GATGGAGAAG
ACGAGACAAG TGGGACGAGA CTCACGACG GAGTCAGAGA CGTCGTCGGT CTTTCGGTTTC
GGCCGAGAAG GCGGAGTCGG TCTTCGGTTT CGGCCGAGAA GGCGGAGGAG ACGTCTTCGA
TTTGGGTCTC TCCTCTTGAC GAAGAAAACA AAGAACCGA GAAATATGA GAAAGAGAAC
AAAAGAAAAA AAAATAAAAA TAAAAATAA ATTTGGTCCT CTATGTGGT GACACGTGGT
TTGAAACCCA CCAATAATC GATCACAAAA AACCTAAGTT AAGGATCGGT AATAACCTTT
CTAATTAATT TTGATTTAAT TAAATCACTC TTTTATTTA TAAACCCAC TAAATTATGC
GATATTGAIT GTCTAAGTAC AAAAATTCTC TCGAATTCAA TACACATGTT TCATATATT
AGCCCTGTTT ATTTAATATT ACTAGCGCAT TTTTAATTTA AAATTTTGTA AACTTTTTTG
GTCAAGAAGC ATTTTTTTAA TTAGAGACAG AAATCTAGAC TCTTTATTGG GAATAATAGT
AATAAAGATA TATTAGGCAA TGAGTTTATG ATGTTATGTT TATATAGTTT ATTTCATTTT
AAATTGAAAA GCATTATTTT TATCGAAATG AATCTAGTAT ACAATCAATA TTTATGTTTT
TTCATCAGAT ACCTTCTCTAT TTTTGGCAC CTTTCATCGG ACTACTGATT TATTCAATG
TGATATGATG CATGAGCATG ACCTATCACA TGTCTTTTAA AATGCTATGA AAGCGTAACG
GACCACAAAA GAGGATCCAT ACAATACAT CTCATCGCTT CCTCTACTAT TCTCCGACAC
ACACACTGAG CAATGACGTC CATTAACTGA AAGCTCCTTT ACCATTACGT C

```

## Abbildung 7

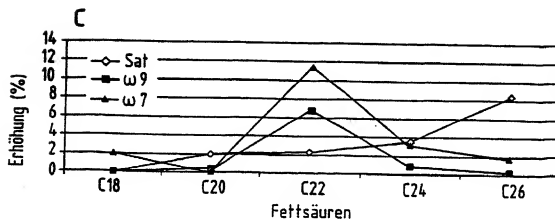
8/8

A

16:0	→	16:1 <sup>Δ9</sup>
↓		↓ EL ω7
18:0	→	18:1 <sup>Δ9</sup>
↓		↓ EL ω9
20:0		20:1 <sup>Δ11</sup>
↓		↓
22:0		22:1 <sup>Δ13</sup>
↓		↓
24:0		24:1 <sup>Δ15</sup>
↓		↓
26:0		26:1 <sup>Δ17</sup>

B

	Gesättigt	ω9	ω7
C16	8.51	-	31.34
C18	2.68	9.17	1.93
C20	1.87	0.38	0.00
C22	2.28	6.87	11.57
C24	3.53	4.86	3.21
C26	8.40	0.30	1.79



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Gesellschaft fuer Erwerb und Verwertung von Schutzrechten -  
GVS mbH  
(B) STRASSE: Kaufmannstr. 71-73  
(C) ORT: Bonn  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 53115 Bonn

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Elongasemotoren fuer gewebespezifische  
Expression von Transgenen in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1785 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AGCGTAACGG ACCACAAAG AGGATCCATA CAAATACATC TCATCGCTTC CTCTACTATT	60
CTCGGACACA CACACTGAGC AATGACGTCC ATTAACGTAA AGCTCCTTTA CCATTACGTC	120
ATAACCAACC TTTTCAACCT TTGCTTCTTT CGGTTAACGG CGATCGTCGC CGGAAAGCC	180
TATCGGCTTA CCATAGACGA TCTTACCAC TTATACTATT CCTATCTCCA ACACAACCTC	240
ATAACCATCG CTCACCTCTT TGCCTTACC GTTTTCGGTT CGGTTCTCTA CATCGCAACC	300
CGGCCCAAC CGGTTTACCT CGTTGAGTAC TCATGCTACC TTCCACCAAC GCATTGTAGA	360
TCAAGTATCT CCAAGTTCAT GGATATCTTT TATCAAGTAA GAAAGCTGA TCCTTCTCGG	420
AACGGCACGT GCGATGACTC GTCGTGGCTT GACTTCTTGA GGAAGATTCA AGAACGTTCA	480
GGTCTAGGCG ATGAAACTCA CGGGCCCGAG GGGCTGCTTC AGTCCCTTCC CCGGAAGACT	540
TTTGGCGGGG GCGGTGAAGA GACGGAGCAA GTTATCATTT GTGCGCTAGA AAATCTATTTC	600
AAGAACACCA ACGTTAACCC TAAAGATATA GGTATACCTG TGGTGAATTC AAGCATGTTT	660
AATCCAATCT CATCGCTCTC CGCGATGATC GTTAACACTT TCAAGCTCCG AAGCAACGTA	720
AGAAGCTTTA ACCTTGGTGT CATGGGTTGT AGTGCCCGCG TTATAGCCAT TGATCTAGCA	780

AAGGACTTGT	TGCATGTCCA	TAAAAATACG	TATGCTCTTG	TGGTGAGCAC	AGAGAACATC	840
ACTTATAACA	TTTACGCTGG	TGATAATAGG	TCCATGATGG	TTTCAAATTG	CTTGTTCCGT	900
GTTGCTGGGG	CCGCTATTTT	GCTCTCCAAC	AAGCCTGGAG	ATCGTAGACG	GTCCAAGTAC	960
GAGCTAGTTC	ACACGGTTTC	AACGCATACC	GGAGCTGACG	ACAAGTCTTT	TCGTTGCGTG	1020
CAACAAGGAG	ACGATGAGAA	CGGCAAAATC	GGAGTGAGTT	TGTCCAAGGA	CATAACCGAT	1080
GTTGCTGCTG	GAACGGTTAA	GAAAAACATA	GCAACGTTGG	GTCCGTTGAT	TCTTCCGTTA	1140
AGCGAGAAAC	TTCTTTTTTT	CGTTACCTTC	ATGGGCAAGA	AACTTTTCAA	AGATAAAATC	1200
AAACATTACT	ACGTCCCGGA	TTTCAAACCT	GCTATTGACC	ATTTTGTGAT	ACATGCCCGA	1260
GGCAGAGCCG	TGATTGATGT	GCTAGAGAAG	AACCTAGCCC	TAGCACCGAT	CGATGTAGAG	1320
GCATCAAGAT	CAACGTTACA	TAGATTTGGA	AACACTTCAT	CTAGCTCAAT	ATGGTATGAG	1380
TTGGCATACA	TAGAAGCAAA	AGGAAGGATG	AAGAAAGGTA	ATAAAGTTTG	GCAGATTGCT	1440
TTAGGGTCAG	GCTTTAAGTG	TAACAGTGCA	GTTTGGGTGG	CTCTAAACAA	TGTCAAAGCT	1500
TCGACAAATA	GTCTTGCGGA	ACACTGCATC	GACAGATACC	CGGTCAAAT	TGATTTCTGAT	1560
TCAGGTAAGT	CAGAGACTCG	TGTCCAAAC	GGTCGGTCTT	AATAATGAT	GTTTGCTCTC	1620
TTTCGTTTCT	TTTTATTGTG	TATAATAATT	TGATGGCTAC	GATGTTTCTC	TTGTTTGTTA	1680
TGAATAAAGA	ATGCAATGGT	GTTCTAGTAT	TTGATTGTTT	TACATGTATG	TATCTCTTAT	1740
TTACATGAAA	TTTTTAAACG	CCTAGGAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAA		1785

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1468 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

AAGCTTTACA	ACGATACACA	AAACTTATAA	CCGTAAATCAC	CATTATTAA	CTTAACACT	60
ATCACATGCA	TTCATGAATT	GAAACGAGAA	GGATGTAAT	AGTTGGGAAG	TTATCTCCAC	120
GTTGAAGAGA	TCGTTAGCGA	GAGCTGAAAG	ACCGAGGGAG	GAGACGCCGT	CAACACGGAC	180
AGAGTCGTCG	ACCCTCACAT	GAAGTAGGAG	GAATCTCCGT	GAGGAGCCAG	AGAGACGTCT	240
TTGCTCTTCG	GTTTCGATCC	TTGATCTGAC	GGAGAAGACG	AGAGAAGTGC	GACTGGACTC	300
CGTGAGGACC	AACAGAGTCG	TCCTCGGTTT	CGATCGTCGG	TATTGGTGGG	GAAGGCGGAG	360
GAATCTCCGT	GACGAGCCAG	AGAGATGTCG	TCGGTCTTCG	GTTTCGATCC	TTGATCTGAC	420
GGAGAAGACG	AGAGAAGTGC	GACGAGACTC	CGTGAGGACC	AACAGAGTTG	TCCTCGGTTT	480





30										35										40										
CAC	TTA	TAC	TAT	TCC	TAT	CTC	CAA	CAC	AAC	CTC	ATA	ACC	ATC	GCT	CCA					255										
His	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Gln	His	Asn	Leu	Ile	Thr	Ile	Ala	Pro															
		45					50						55																	
CTC	TTT	GCC	TTC	ACC	GTT	TTC	GGT	TCG	GTT	CTC	TAC	ATC	GCA	ACC	CGG					303										
Leu	Phe	Ala	Phe	Thr	Val	Phe	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Ile	Ala	Thr	Arg															
		60				65					70																			
CCC	AAA	CCG	GTT	TAC	CTC	GTT	GAG	TAC	TCA	TGC	TAC	CTT	CCA	CCA	ACG					351										
Pro	Lys	Pro	Val	Tyr	Leu	Val	Glu	Tyr	Ser	Cys	Tyr	Leu	Pro	Pro	Thr															
	75				80					85				90																
CAT	TGT	AGA	TCA	AGT	ATC	TCC	AAG	GTC	ATG	GAT	ATC	TTT	TAT	CAA	GTA					399										
His	Cys	Arg	Ser	Ser	Ile	Ser	Lys	Val	Met	Asp	Ile	Phe	Tyr	Gln	Val															
				95				100						105																
AGA	AAA	GCT	GAT	CCT	TCT	CGG	AAC	GGC	ACG	TGC	GAT	GAC	TCG	TCG	TGG					447										
Arg	Lys	Ala	Asp	Pro	Ser	Arg	Asn	Gly	Thr	Cys	Asp	Asp	Ser	Ser	Trp															
			110					115					120																	
CTT	GAC	TTC	TTG	AGG	AAG	ATT	CAA	GAA	CGT	TCA	GGT	CTA	GGC	GAT	GAA					495										
Leu	Asp	Phe	Leu	Arg	Lys	Ile	Gln	Glu	Arg	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	Glu															
		125					130					135																		
ACT	CAC	GGG	CCC	GAG	GGG	CTG	CTT	CAG	GTC	CCT	CCC	CGG	AAG	ACT	TTT					543										
Thr	His	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Leu	Gln	Val	Pro	Arg	Lys	Thr	Phe																
		140				145					150																			
GCG	GCG	GCG	CGT	GAA	GAG	ACG	GAG	CAA	GTT	ATC	ATT	GGT	GCG	CTA	GAA					591										
Ala	Ala	Ala	Arg	Glu	Glu	Thr	Glu	Gln	Val	Ile	Ile	Gly	Ala	Leu	Glu															
		155			160					165				170																
AAT	CTA	TTC	AAG	AAC	ACC	AAC	GTT	AAC	CCT	AAA	GAT	ATA	GGT	ATA	CTT					639										
Asn	Leu	Phe	Lys	Asn	Thr	Asn	Val	Asn	Pro	Lys	Asp	Ile	Gly	Ile	Leu															
			175					180					185																	
GTG	GTG	AAC	TCA	AGC	ATG	TTT	AAT	CCA	ACT	CCA	TCG	CTC	TCC	GCG	ATG					687										
Val	Val	Asn	Ser	Ser	Met	Phe	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Met															
		190						195					200																	
GTC	GTT	AAC	ACT	TTT	AAG	CTC	CGA	AGC	AAC	GTA	AGA	AGC	TTT	AAC	CTT					735										
Val	Val	Asn	Thr	Phe	Lys	Leu	Arg	Ser	Asn	Val	Arg	Ser	Phe	Asn	Leu															
		205				210						215																		
GGT	GGC	ATG	GGT	TGT	AGT	GCC	GGC	GTT	ATA	GCC	ATT	GAT	CTA	GCA	AAG					783										
Gly	Gly	Met	Gly	Cys	Ser	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys															
		220				225					230																			
GAC	TTG	TTG	CAT	GTC	CAT	AAA	AAT	ACG	TAT	GCT	CTT	GTG	GTG	AGC	ACA					831										
Asp	Leu	Leu	His	Val	His	Lys	Asn	Thr	Tyr	Ala	Leu	Val	Val	Ser	Thr															
		235			240				245				250																	
GAG	AAC	ATC	ACT	TAT	AAC	ATT	TAC	GCT	GGT	GAT	AAT	AGG	TCC	ATG	ATG					879										
Glu	Asn	Ile	Thr	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Asn	Arg	Ser	Met	Met															
				255				260					265																	
GTT	TCA	AAT	TGC	TTT	TTC	CGT	GTT	GGT	GGG	GCC	GCT	ATT	TTG	CTC	TCC					927										
Val	Ser	Asn	Cys	Leu	Phe	Arg	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser															
			270					275					280																	

AAC AAG CCT GGA GAT CGT AGA CGG TCC AAG TAC GAG CTA GTT CAC ACG Asn Lys Pro Gly Asp Arg Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Val His Thr 285 290 295	975
GTG CGA ACG CAT ACC GGA GCT GAC GAC AAG TCT TTT CGT TGC GTG CAA Val Arg Thr His Thr Gly Ala Asp Asp Lys Ser Phe Arg Cys Val Gln 300 305 310	1023
CAA GGA GAC GAT GAG AAC GGC AAA ATC GGA GTG AGT TTG TCC AAG GAC Gln Gly Asp Asp Glu Asn Gly Lys Ile Gly Val Ser Leu Ser Lys Asp 315 320 325 330	1071
ATA ACC GAT GTT GCT GGT CGA ACG GTT AAG AAA AAC ATA GCA ACG TTG Ile Thr Asp Val Ile Gly Arg Thr Val Lys Lys Asn Ile Ala Thr Leu 335 340 345	1119
GGT CCG TTG ATT CTT CCG TTA AGC GAG AAA CTT CTT TTT TTC GTT ACC Gly Pro Leu Ile Leu Pro Leu Ser Glu Lys Leu Leu Phe Phe Val Thr 350 355 360	1167
TTC ATG GGC AAG AAA CTT TTC AAA GAT AAA ATC AAA CAT TAC TAC GTC Phe Met Gly Lys Lys Leu Phe Lys Asp Lys Ile Lys His Tyr Tyr Val 365 370 375	1215
CCG GAT TTC AAA CTT GCT ATT GAC CAT TTT TGT ATA CAT GCC GGA GGC Pro Asp Phe Lys Leu Ala Ile Asp His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly 380 385 390	1263
AGA GCC GTG ATT GAT GTG CTA GAG AAG AAC CTA GCC CTA GCA CCG ATC Arg Ala Val Ile Asp Val Leu Glu Lys Asn Leu Ala Leu Ala Pro Ile 395 400 405 410	1311
GAT GTA GAG GCA TCA AGA TCA ACG TTA CAT AGA TTT GGA AAC ACT TCA Asp Val Glu Ala Ser Arg Ser Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser 415 420 425	1359
TCT AGC TCA ATA TGG TAT GAG TTG GCA TAC ATA GAA GCA AAA GGA AGG Ser Ser Ser Ile Trp Tyr Glu Leu Ala Tyr Ile Glu Ala Lys Gly Arg 430 435 440	1407
ATG AAG AAA GGT AAT AAA GTT TGG CAG ATT GCT TTA GGG TCA GGC TTT Met Lys Lys Gly Asn Lys Val Trp Gln Ile Ala Leu Gly Ser Gly Phe 445 450 455	1455
AAG TGT AAC AGT GCA GTT TGG GTG GCT CTA AAC AAT GTC AAA GCT TCG Lys Cys Asn Ser Ala Val Trp Val Ala Leu Asn Asn Val Lys Ala Ser 460 465 470	1503
ACA AAT AGT CCT TGG GAA CAC TGC ATC GAC AGA TAC CCG GTC AAA ATT Thr Asn Ser Pro Trp Glu His Cys Ile Asp Arg Tyr Pro Val Lys Ile 475 480 485 490	1551
GAT TCT GAT TCA GGT AAG TCA GAG ACT CGT GTC CAA AAC GGT CGG TCC Asp Ser Asp Ser Gly Lys Ser Glu Thr Arg Val Gln Asn Gly Arg Ser 495 500 505	1599
TAATAAATGA TGTTTGCTCT CTTCGTTTC TTTTATTGTT TTATAATAAT TIGATGGCTA	1659
CGATGTTTCT CTGTGTTGTT ATGAATAAAG AATGCAATGG TGTTCTAGTA TTGATTGTTT	1719
TTACATGTAT GTATCTCTTA TTTACATGAA ATTTTAAAC GCCTAGGAAA AAAAAAAAAA	1779

WO 01/29238

PCT/EP00/10363

AAAAAA

6

1785